

# **Protein Phosphatase 4 ist ein neuer Regulator der circadianen Uhr in Säugern**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat. )

im Fach Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Dipl. Ing. Sabrina Klemz**  
geb. Wendt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Stefan Hecht PhD

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
2. Prof. Dr. Achim Kramer
3. Prof. Dr. David Gatfield

Tag der mündlichen Prüfung: 18. August 2014



## ZUSAMMENFASSUNG

Circadiane Uhren sind endogene Oszillatoren, die tägliche Rhythmen in Physiologie, Metabolismus und Verhalten steuern. Studien der letzten Jahrzehnte haben sehr viele Erkenntnisse über die Regulation des circadianen Zeitsystems geliefert. Dabei wurden Gene identifiziert, die für die Generierung und Aufrechterhaltung einer funktionalen circadianen Uhr essentiell sind. Eine wesentliche Frage ist jedoch noch weitgehend ungeklärt: Wie greifen diese fundamentalen Zahnräder ineinander um eine 24 Stunden Periode zu generieren. Auf molekularem Level wird die Dynamik der circadianen Oszillation (wie Periode, Amplitude, Phase) über ein genregulatorisches Netzwerk aus transkriptionellen-translationalen Rückkopplungsschleifen gesteuert. Neben der transkriptionellen Regulation, sind auch posttranslationale Modifikationen von Uhrproteinen, wie z. B. die reversible Phosphorylierung, für eine präzise Justierung der circadianen Periode von großer Bedeutung. Die Proteinphosphorylierung spielt dabei für die Regulation von Aktivität, Stabilität und intrazellulärer Lokalisation von Uhrproteinen eine wichtige Rolle. Bisher sind verschiedene Kinasen als Modulatoren der circadianen Uhr charakterisiert worden. Jedoch ist eine funktionale Rolle von Protein Phosphatasen für die Regulation der circadianen Uhr in Säugern bisher nur unzureichend untersucht.

In dieser Arbeit wurde mittels eines systematischen RNAi-basierten Screenings in oszillierenden humanen Zellen untersucht, ob sich die gezielte Depletion einzelner katalytischer Untereinheiten der PPP-Familie der Serin/Threonin-Phosphatasen auf die normale Oszillationsdynamik auswirkt und welche Rolle ausgewählte Phosphatase-Kandidaten für die posttranslationale Kontrolle des molekularen Oszillators spielen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die RNAi vermittelte Depletion von *Protein Phosphatase 4 (Pp4c)* gewebe- und spezieübergreifend zu einer signifikant kurzen circadianen Periode führt, während die Überexpression von wildtypischer *Pp4c* in einer stark reprimierten Amplitude resultiert. Beide Periodenphänotypen sind auch auf Ebene der Uhrgenexpression erkennbar, was darauf hindeutet, dass die Gendosis von *Pp4c* für die molekulare Rhythmusgenerierung essentiell ist. Mechanistische Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von PP4c für die Regulation der circadianen Uhr zeigten, dass PP4c womöglich eine duale Rolle spielt: Einerseits ist PP4c innerhalb der positiven Rückkopplungsschleife in die direkte Aktivierung des *Bmal1*-Promotors über RRE-Elemente involviert. Andererseits wirkt PP4c innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife inhibierend auf die CLOCK/BMAL1-vermittelte, E-Box getriebene Genexpression. Ein in dieser Arbeit favorisiertes Modell fundiert auf der Vermutung, dass eine durch PP4c induzierte – eventuell phasenspezifische – Modulation des Phosphorylierungsstatus von BMAL1 zu einem stabilen, aber transkriptionsinaktiven BMAL1 und damit zu einer verstärkten Repression der Uhrgentranskription führt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung von Ser/Thr-Phosphatasen – insbesondere PP4c – als regulatorisches Zahnrad der circadianen Oszillationsdynamik in Säugern und liefern erste mechanistische Grundlagen. Die Herausforderung zukünftiger Untersuchungen wird sein, die spezifischen molekularen Mechanismen, wie PP4c die circadiane Periode modulieren kann, aufzudecken. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stehen insbesondere die zentralen Fragen, mit welchen Proteinen PP4c spezifisch interagiert, welche Phosphorylierungsstellen dieser Interaktionspartner reguliert werden und welche Auswirkungen diese spezifischen Dephosphorylierungsreaktionen auf die Oszillationsdynamik haben.



# INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
-----------------------	----

TABELLENVERZEICHNIS	XI
---------------------	----

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das biologische Zeitsystem: grundlegende Eigenschaften circadianer Uhren .	2
1.2	hierarchische Organisation des circadianen Zeitsystems in Säugern . . . . .	3
1.3	Der molekulare circadiane Oszillator in Säugern . . . . .	6
1.4	Die Bedeutung posttranslationaler Modifikationen für die Oszillationsdynamik	8
1.5	Die reversible Protein-Phosphorylierung . . . . .	9
1.6	Die Relevanz der Protein-Phosphorylierung im circadianen Uhrwerk . . . .	12
1.6.1	Die Rolle der Kinasen . . . . .	12
1.6.2	Die Rolle der Phosphatasen . . . . .	15
1.7	Zielstellung . . . . .	22
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Bezugsquellennachweis . . . . .	25
2.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	26
2.2.1	Medien- und Pufferformulierungen . . . . .	26
2.2.2	Gateway®-Klonierung . . . . .	26
2.2.3	Transformation von Bakterien . . . . .	27
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA . . . . .	27
2.2.5	Agarosegel-Elektrophorese . . . . .	27
2.2.6	Restriktionsverdau . . . . .	28
2.2.7	Sequenzspezifische Mutagenese . . . . .	28
2.2.8	Expressionsvektoren . . . . .	29
2.2.9	RNA-Extraktion . . . . .	29
2.2.10	Reverse Transkription . . . . .	31
2.2.11	Quantitative Real-Time PCR . . . . .	31

2.3	Zellbiologische Methoden . . . . .	33
2.3.1	Puffer . . . . .	33
2.3.2	Zellkulturmedien . . . . .	33
2.3.3	Zelllinien . . . . .	33
2.3.4	Zellkultur . . . . .	33
2.3.5	Transiente Transfektion . . . . .	36
2.3.6	Virusproduktion von Lentiviren in HEK 293T . . . . .	37
2.3.7	Lentivirale Transduktion . . . . .	39
2.3.8	Messung der Oszillationsdynamik in lebenden Zellen . . . . .	40
2.3.9	Messung der circadianen Expression von Uhrgenen . . . . .	41
2.4	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	41
2.4.1	Puffer . . . . .	41
2.4.2	Proteinextraktion . . . . .	43
2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	44
2.4.4	SDS-PAGE . . . . .	44
2.4.5	Westernblot . . . . .	45
2.4.6	Immunpräzipitation . . . . .	46
2.4.7	Chromatin-Immunpräzipitation . . . . .	47
2.4.8	Cycloheximid-Experimente . . . . .	48
2.4.9	Transaktivierung von E-Box und RRE-Elementen . . . . .	49
3	ERGEBNISSE	51
3.1	RNAi-basiertes circadianes Screening in humanen Zellen nach Ser/Thr- Phosphatasen . . . . .	51
3.2	PP4c moduliert die circadiane Oszillationsdynamik . . . . .	56
3.2.1	RNAi vermittelte <i>Pp4c</i> -Depletion in humanen Zellen . . . . .	57
3.2.2	Gewebe- und spezieübergreifende Reproduktion des circadianen Phänotyps . . . . .	58
3.2.3	Überexpression von wildtypischer <i>Pp4c</i> und einer dominant negativen Mutante . . . . .	60
3.2.4	Wiederherstellung der wildtypischen Periode in <i>Pp4c</i> depletierten Zellen . . . . .	61
3.3	Mechanistische Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von PP4c für die Regulation der circadianen Uhr . . . . .	63
3.3.1	Die Gendosis von <i>Pp4c</i> beeinflusst die circadiane Expression von Uhrgenen . . . . .	63
3.3.2	Entwicklung hypothetischer Arbeitsmodelle für die Rolle von PP4c in der circadianen Uhr . . . . .	66
3.3.3	PP4c wirkt aktivierend auf den <i>Bmal1</i> -Promotor und moduliert die Bindung von HDAC3 . . . . .	69
3.3.4	PP4c interagiert mit essentiellen Uhrproteinen . . . . .	75
3.3.5	PP4c hat keine funktionelle Relevanz für die Stabilität von Uhrproteinen	76
3.3.6	Die CLOCK/BMAL1-vermittelte E-Box Transaktivierung wird durch PP4c inhibiert . . . . .	78

3.3.7	Die Bindung von BMAL1 an E-Boxen ist abhängig von der <i>Pp4c</i> Gendosis . . . . .	79
4	DISKUSSION . . . . .	83
4.1	Die Bedeutung von Phosphatasen für die circadiane Uhr von Säugern . . . .	85
4.1.1	Die Relevanz von Phosphatasen . . . . .	85
4.1.2	<i>loss-of-function</i> Screening nach veränderten circadianen Phänotypen . . . .	86
4.1.3	Protein Phosphatase 4 als potentieller Regulator der circadianen Uhr . . . .	88
4.2	Mechanistische Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von PP4c . . . .	90
4.2.1	Die <i>Pp4c</i> Gendosis beeinflusst die Transkription von circadianen Uhrgenen . . . . .	90
4.2.2	Hypothese 1: PP4c wirkt auf die <i>Bmal1</i> -Transkription aktivierend . . . .	91
4.2.3	Hypothese 2: PP4c wirkt inhibierend auf die E-Box getriebene Transkription von Uhrgenen . . . . .	94
4.3	Ausblick . . . . .	99
	ANHANG . . . . .	105
1	RNAi-basiertes circadianes Screening in humanen Zellen nach Ser/Thr-Phosphatasen . . . . .	105
2	PP4c moduliert die circadiane Oszillationsdynamik . . . . .	108
3	PP2A beeinflusst die Oszillationsdynamik der circadianen Uhr . . . . .	112
	ABKÜRZUNGEN . . . . .	117
	LITERATURVERZEICHNIS . . . . .	119
	DANKSAGUNG . . . . .	131
	PUBLIKATIONEN . . . . .	135





# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Hierarchische Organisation des circadianen Systems in Säugern . . . . .	5
1.2	Vereinfachtes Modell des molekularen Oszillators in Säugern . . . . .	7
1.3	Klassifizierung der Phosphatasen und die katalytischen Domänen der PPP-Familie . . . . .	10
3.1	Gezielte RNAi-vermittelte mRNA-Depletion katalytischer Untereinheiten humaner Ser/Thr-Phosphatasen beeinflusst die circadiane Oszillationsdynamik	53
3.2	Funktionelle Redundanz der katalytischen Ser/Thr-Phosphatase-Isoformen im circadianen Oszillator . . . . .	55
3.3	Genetische Depletion von <i>Pp4c</i> verkürzt die circadiane Periode in U-2 OS/ <i>Bmal1-Luciferase</i> Reporterzellen . . . . .	58
3.4	Genetische Depletion von <i>Pp4c</i> verkürzt die circadiane Periode in primären PER2::LUC Mausfibroblasten und einer humanen <i>Per2-Luciferase</i> Astrozyten Zelllinie . . . . .	59
3.5	Ektopische Überexpression von <i>Pp4c</i> und einer dominant-negativen <i>Pp4c</i> Mutante beeinflussen die Oszillationsdynamik in U-2 OS/ <i>Bmal1-Luciferase</i> Reporterzellen . . . . .	61
3.6	Ektopische Überexpression von <i>Pp4c</i> , nicht aber von der dominant-negativen Mutante, revertiert den kurzen Periodenphänotyp bei <i>Pp4c</i> -Depletion . . .	62
3.7	Reduktion der <i>Pp4c</i> Gendosis beeinflusst die circadiane Expression von endogenen Uhrgenen . . . . .	65
3.8	Ektopische Überexpression von <i>Pp4c</i> beeinflusst die Amplitude der circadianen Uhrgen-Expression . . . . .	66
3.9	Hypothetische Arbeitsmodelle für die funktionelle Rolle von PP4c in der circadianen Uhr . . . . .	67
3.10	Überexpression von <i>Pp4c</i> moduliert die Transaktivierung an regulativen RRE-Promotorelementen . . . . .	70
3.11	Genetische Depletion von <i>Pp4c</i> beeinflusst die Bindung und Aktivität von HDAC3 an RRE-Elementen im Promotor von <i>Bmal1</i> . . . . .	73
3.12	Die durch <i>Pp4c</i> mRNA-Depletion induzierte kurze Periode wird nicht über die HDAC3-Aktivität vermittelt . . . . .	74
3.13	PP4c interagiert mit den inhibitorischen circadianen Uhrproteinen PER1, PER2 und CRY2 . . . . .	76
3.14	PP4c hat keine deutlich messbare Wirkung auf die Stabilität von essentiellen Uhrproteinen . . . . .	77
3.15	Überexpression von <i>Pp4c</i> moduliert die CLOCK/BMAL1-vermittelte Transaktivierung von E-Boxen . . . . .	79

3.16	Die Gendosis von <i>Pp4c</i> beeinflusst die Bindung von BMAL1 an E-Boxen in den Promotoren von Uhrgenen . . . . .	81
4.1	Modell einer PP4c-Funktion in der circadianen Uhr von Säugern . . . . .	98
2	Genetische Depletion von <i>Pp4c</i> verkürzt die circadiane Periode in U-2 OS/ <i>Per2-Luciferase</i> Reporterzellen . . . . .	108
3	Ektopische Überexpression von <i>Pp4c</i> beeinflusst die Oszillationsdynamik in U-2 OS/ <i>Per2-Luciferase</i> Reporterzellen . . . . .	109
4	RNAi basiertes Screening nach regulatorischen Untereinheiten der PP4c, die die circadiane Oszillationsdynamik beeinflussen . . . . .	110
5	PP2A beeinflusst die Oszillationsdynamik . . . . .	114

# TABELLENVERZEICHNIS

1.1	Die PPP-Familie der humanen Ser/Thr-Phosphatasen . . . . .	11
1.2	Beispiele für die Aktivität von Kinasen und die Funktion verschiedener Phosphorylierungsstellen auf Uhrproteinen im circadianen Oszillator von Säugetern . . . . .	14
1.3	Funktion von Ser/Thr-Phosphatasen in der circadianen Uhr verschiedener Modellorganismen . . . . .	17
2.1	Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und Reagenzien . . . . .	25
2.2	Mutagenese-Primer zur Herstellung der Mutante PP4c mut . . . . .	29
2.3	Basis- und Expressionsvektoren . . . . .	30
2.4	Primer für die quantitative Real-Time PCR . . . . .	32
2.5	Zellkulturmedien . . . . .	34
2.6	Standard-Zelllinien und daraus generierte Reporter-Zelllinien . . . . .	35
2.7	Lentivirusproduktion im großen Maßstab . . . . .	39
2.8	lentivirale Transduktion in verschiedenen Experimenten . . . . .	40
2.9	Antikörper für Westernblot, Immunpräzipitation und ChIP-Experimente . .	46
2.10	qPCR-Primer für Chromatin-Immunpräzipitationen . . . . .	48
1	Gezielte genetische mRNA-Depletion katalytischer Untereinheiten humaner Ser/Thr-Phosphatasen beeinflusst die circadiane Oszillationsdynamik . . . .	105
2	Funktionelle Redundanz der katalytischen Ser/Thr-Phosphatasen im circa- dianen Oszillator . . . . .	107
3	shRNA-Konstrukte für die mRNA-Depletion von <i>Pp4c</i> regulatorischen Un- tereinheiten . . . . .	111
4	shRNA-Konstrukte für die mRNA-Depletion von <i>Pp2A</i> regulatorischen Untereinheiten . . . . .	116



# 1 EINLEITUNG

Rhythmen sind Prozesse, die periodisch in Erscheinung treten. Unser Planet – die Erde – rotiert um seine eigene Achse. Dies erzeugt auf der Erde, die von der Sonne mit Energie, u.a. in Form von Licht und Wärme, bestrahlt wird, Rhythmen von wiederkehrenden täglichen Licht- und Dunkelphasen. Die Dauer der Sonneneinwirkung, also der Lichtphase, an verschiedenen Punkten der Erde variiert in Abhängigkeit vom Breitengrad und der Jahreszeit. So ist z. B. die Lichtphase des Tages im Sommer länger als im Winter. Unabhängig davon ist allerdings der Rhythmus des wiederkehrenden Sonnenaufgangs, welcher bedingt durch die Erdrotation eine Periode von nahezu exakt 24 Stunden hat. Verbunden mit den wechselnden Lichtverhältnissen gehen weitere Rhythmen von meteorologischen Faktoren, wie Temperaturschwankungen, einher. Damit sind Lebewesen auf der Erde drastischen wechselnden Faktoren in ihren Lebensräumen ausgesetzt. In der gesamten Welt der Lebewesen – von Bakterien über Pilze und Pflanzen, Insekten, bis hin zu den Wirbeltieren – finden sich 24 Stunden Rhythmen, wie es z. B. am Wechsel von Schlaf- und Wachphasen bei Tieren, oder den Öffnungs- und Schließphasen der Blüten bei Pflanzen zu beobachten ist. Eine naheliegende Erklärung wäre, dass sich die Lebewesen passiv an die täglichen Wechsel in der Umwelt anpassen. Allerdings reagieren die Organismen nicht einfach nur auf Veränderungen ihrer Umwelt. Interessanterweise persistieren diese circa 24 Stunden Rhythmen auch ohne äußere Faktoren, was als ein grundlegendes Prinzip einer circadianen Uhr definiert ist (siehe Kapitel 1.1). Somit besitzen diese Lebewesen einen präzisen und robusten Mechanismus, die Zeit einer circa 24-stündigen Periode (einem circadianen Rhythmus) messen und somit die Veränderungen der Umwelt antizipieren zu können. So unterliegt der Organismus einer zeitlich organisierten Physiologie, was sehr wahrscheinlich in einem natürlichen Selektionsvorteil begründet ist (siehe Kapitel 1.2).

Heute weiß man, dass diese circadianen Rhythmen durch Oszillationen auf molekularer

Ebene generiert werden und zumindest in Säugern nahezu jede Zelle einen solchen Mechanismus besitzt. Eine der Herausforderungen in der Chronobiologie ist die Aufklärung des molekularen Mechanismus des circadianen Oszillators. Im Säuger ist das grundlegende Prinzip eines molekularen Oszillators die Erzeugung von Rückkopplungsschleifen durch Proteine, die nach ihrer Translation zeitlich verzögert die eigene Transkription inhibieren (siehe Kapitel 1.3). Die hauptsächlich an der circadianen Rhythmusgenerierung beteiligten Komponenten sind bekannt. Allerdings wird dieser Mechanismus durch Regulationen auf verschiedenen Ebenen komplex organisiert und um die Periode von circa 24 Stunden zu justieren ist ein Netzwerk aus sehr vielen – teilweise noch unbekannten – Regulatoren erforderlich. Regulationsmechanismen sind neben der Transkriptionskontrolle und posttranskriptionellen Ereignissen, vor allem posttranslationale Modifikationen von Uhrproteinen (siehe Kapitel 1.4). Eine bedeutende Rolle spielt dabei die reversible Phosphorylierung (siehe Kapitel 1.5). In den letzten Jahren wurden sehr viele Kenntnisse über die Wirkungsweise von Kinasen, die Proteine phosphorylieren, im circadianen Uhrwerk gewonnen. Allerdings wurden im Säuger bisher die Gegenspieler der Kinasen– die Phosphatasen, welche Phosphatgruppen von Proteinen abspalten– nur wenig untersucht. Da ein komplex reguliertes Gleichgewicht von Kinasen und Phosphatasen den Phosphorylierungsgrad und damit die momentane räumlich-zeitliche Funktion eines Proteins bestimmt, spielen Phosphatasen für die Generierung des circadianen Rhythmus vermutlich eine ebenso wichtige Rolle (siehe Kapitel 1.6).

Die folgenden Kapitel geben einen Einblick in die grundlegenden Eigenschaften der circadianen Uhr. Zudem wird der aktuelle Kenntnisstand über den molekularen Mechanismus des circadianen Uhrwerks in Säugern, mit besonderem Fokus auf die für diese Arbeit relevante Bedeutung der reversiblen Phosphorylierung von Uhrproteinen, erläutert.

### 1.1 DAS BIOLOGISCHE ZEITSYSTEM: GRUNDLEGENDE EIGENSCHAFTEN CIRCADIANER UHREN

Als Konsequenz der Erdrotation sind nahezu alle Organismen einem täglichen Wechsel von Licht- und Dunkelzyklen (auch Temperaturzyklen) ausgesetzt. Unabhängig unterschiedlicher phylogenetischer Ursprünge und der Komplexität verschiedener Spezies, haben die

Organismen im Laufe der Evolution ein internes Zeitsystem entwickelt, das es erlaubt, die biologischen Prozesse mit den externen Umgebungsbedingungen (sog. externe Zeitgeber) zu synchronisieren und damit das Verhalten (z. B. Schlaf-Wach-Rhythmus, lokomotorische Aktivität) sowie physiologische (z. B. endokrine Rhythmen, Körpertemperatur) und metabolische Prozesse bestmöglich an die tageszeitlichen Schwankungen anzupassen. Dieses Zeitsystem wird als „circadiane Uhr“ bezeichnet (abgeleitet aus dem Lateinischen *circa diem* „ungefähr ein Tag“). Obwohl der biologische Hintergrund und die Mechanismen für circadiane Rhythmen zwischen verschiedenen Organismen unterschiedlich sind, besitzen circadiane Uhren charakteristische Eigenschaften, die allen Arten gemeinsam sind:

- Circadiane Uhren generieren einen endogenen Rhythmus mit einer ca. 24 h Periode.
- Circadiane Rhythmen sind selbsterhaltend und damit auch unter konstanten Bedingungen, also in Abwesenheit von externen Zeitgebern persistent.
- Circadiane Uhren werden über sog. Zeitgeber (z. B. Licht oder Temperatur) mit der Außenwelt synchronisiert (Entrainment).
- Circadiane Rhythmen sind zellautonom und existieren in nahezu jeder Zelle peripherer Organe und selbst in kultivierten Zellen.
- Die endogene circadiane Periode ist temperaturkompensiert.

## 1.2 HIERARCHISCHE ORGANISATION DES CIRCADIANEN ZEITSYSTEMS IN SÄUGERN

Das circadiane Zeitsystem in Säugern ist in einem hierarchischen Netzwerk organisiert, bestehend aus einem zentralen Haupttaktgeber – dem sog. suprachiasmatischen Nukleus (SCN) – und peripheren Oszillatoren in nahezu jeder Zelle des Organismus [Yamazaki et al., 2000; Reppert und Weaver, 2002; Schibler und Sassone-Corsi, 2002; Schibler und Naef, 2005].

Der SCN ist in einem kleinen Gehirnnareal des Hypothalamus direkt über der Kreuzung der Sehnerven (dem optischen Chiasma) lokalisiert. Er besteht aus einem bilateralen Verbund aus ca. 20000 untereinander gekoppelten Neuronen, die durch ein intrinsisches

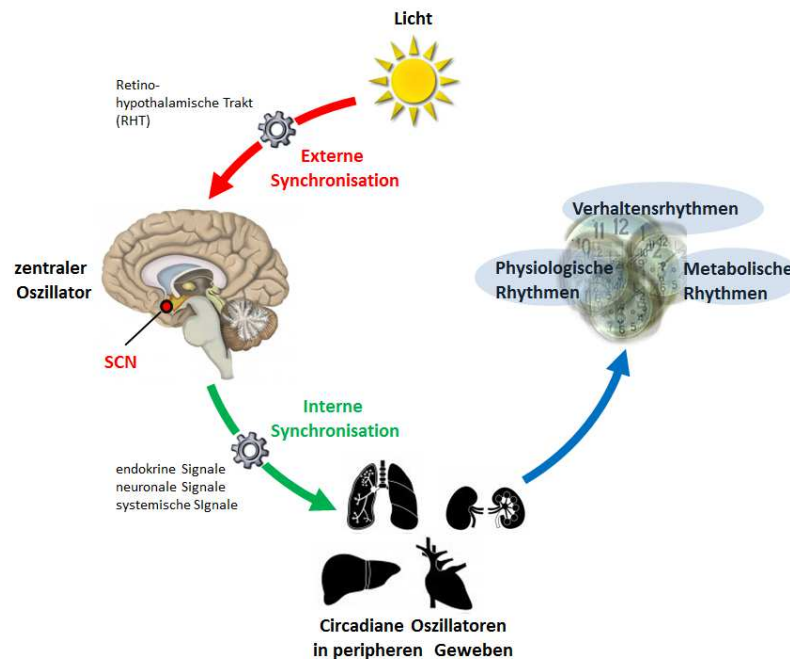
molekulares Uhrenwerk eine selbsterhaltende Oszillation mit einer Periode von circa einem Tag (circadian) generieren [Moore et al., 2002]. Durch Läsions- sowie Transplantationsexperimente in Nagetieren konnte demonstriert werden, dass der SCN für die Aufrechterhaltung einer normalen circadianen Rhythmik essentiell ist [Ralph et al., 1990]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Uhrgenexpression und die elektrophysiologische Aktivität des SCN selbst *ex vivo* in Kultur – entweder als Gewebeverband oder als isolierte Einzelzellen – weiterhin robust oszillieren. Allerdings weichen die intrinsischen Perioden und Phasen der Oszillation in den einzelnen SCN Neuronen stark voneinander ab, was daraufhin deutet, dass der SCN auf Zellpopulationsebene aus individuellen gekoppelten Oszillatoren besteht, die erst durch direkten Zellkontakt und -kommunikation einen koordinierten circadianen Rhythmus generieren [Welsh et al., 1995; Yamaguchi et al., 2003; Liu et al., 2007b].

Die große Bedeutung des SCN liegt darin, intrazellulär einen kohärenten circadianen Rhythmus zu erzeugen und eine präzise Koordination der Rhythmen in der Außenwelt (externe Synchronisation) mit den tageszeitspezifischen Rhythmen peripherer Organe im Organismus (interne Synchronisation) zu erzielen (siehe Abb. 1.1).

Bei der externen Synchronisation wird der SCN durch Licht als den primären Zeitgeber mit den rhythmischen Lichtbedingungen synchronisiert. Über photorezeptive und phototransduktive Mechanismen wird dabei die Lichtinformation im SCN integriert: Neben den bekannten Stäbchen und Zapfen in der Netzhaut existieren spezielle licht-sensitive Zellen, die sog. retinalen Ganglienzellen, welche den Rezeptor Melanopsin verwenden, um die Lichtstärke über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) an den SCN zu transferieren. Das Zusammenspiel verschiedener Neurotransmitter (wie z. B. Glutamat, PACAP und VIP) induziert intrazellulär genregulatorische Signalkaskaden und bewirkt dadurch eine molekulare Synchronisation der multioszillatorischen SCN-Neuronen [Aton und Herzog, 2005; Maywood et al., 2006b].

Der im SCN erzeugte kohärente circadiane Rhythmus koordiniert seinerseits über ein noch weitgehend unbekanntes komplexes Zusammenspiel aus neuronalen, hormonellen und weiteren systemischen Signalen (interne Synchronisation) rhythmische Prozesse in den molekularen Oszillatoren von peripheren Organen und reguliert damit das Verhalten (z. B. Schlaf-Wach-Rhythmus, lokomotorische und kognitive Aktivität), sowie physiologische (z. B. endokrine Rhythmen, Körpertemperatur, Immunfunktionen) und metabolische Prozesse





**Abb. 1.1: Hierarchische Organisation des circadianen Systems in Säugern**

Das circadiane System in Säugern ist in einem hierarchischen Netzwerk organisiert, bestehend aus einem zentralen Haupttaktgeber – dem SCN – und untergeordneten peripheren Oszillatoren. Die Bedeutung des SCN liegt darin, intrazellulär einen kohärenten circadianen Rhythmus zu erzeugen und eine präzise Koordination der Rhythmen in der Außenwelt (externe Synchronisation) mit den tageszeitspezifischen Rhythmen peripherer Organe im Organismus (interne Synchronisation) zu erzielen. Einerseits wird durch die externe Synchronisation der Rhythmus des SCN-Oszillators über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) mit den zyklischen Lichtbedingungen gekoppelt. Andererseits synchronisiert der SCN seinerseits über ein noch weitgehend unbekanntes komplexes Zusammenspiel aus neuronalen, endokrinen und weiteren systemischen Signalen alle rhythmischen Prozesse in den molekularen Oszillatoren von peripheren Organen und reguliert damit tageszeitspezifisch das Verhalten sowie physiologische und metabolische Prozesse.

[Reppert und Weaver, 2002; Liu et al., 2007a; Albrecht, 2012].

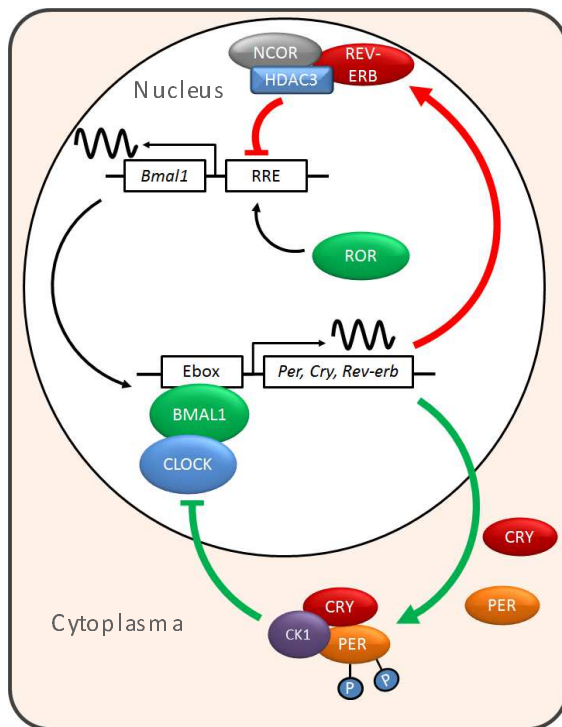
Eine dauerhafte Fehlsteuerung der inneren Uhr durch Genmutationen oder eine mangelnde Synchronisation der inneren Uhr mit der Umwelt, hervorgerufen z. B. durch abrupte Zeitzonewechsel (Jetlag) oder Schichtarbeit, können zu schwerwiegenden gesundheitlichen Beschwerden wie beispielsweise Schlafstörungen, verminderte Leistungsfähigkeit, Herzkrankheiten, Depression, metabolische Erkrankungen oder Krebs führen. Damit kommt die Relevanz einer circadianen Uhr für den komplexen Organismus zum Ausdruck. [Maywood et al., 2006a; Vanselow et al., 2006; Bass und Takahashi, 2010; Dibner et al., 2010; Bechtold et al., 2010].

### 1.3 DER MOLEKULARE CIRCADIANE OSZILLATOR IN SÄUGERN

Nahezu alle Zellen im Organismus – wie beispielsweise SCN Neuronen, Hepatozyten, Lungenepithelzellen, Makrophagen und Fibroblasten – besitzen eine circadiane Uhr, deren fundamentaler molekularer Mechanismus der Rhythmusgenerierung zellautonom abläuft und in vielen Spezies hoch konserviert ist. Durch eine Vielzahl molekulargenetischer Ansätze und Charakterisierungen von Mäusen mit gezielten Gendelektionen, die zu veränderten circadianen Phänotypen führen [Lowrey und Takahashi, 2004; Hirayama und Sassone-Corsi, 2005; Uchida et al., 2010], ist es in den letzten Jahren gelungen, zahlreiche essentielle Uhrgene zu identifizieren und ein grundlegendes Modell für die Entstehung der circadianen Rhythmik auf zellulärer Ebene zu etablieren (siehe Abb. 1.2).

Auf molekularer Ebene wird der circadiane Rhythmus über ein Netzwerk von Uhrgenen, die eine autoinhibitorische Rückkopplungsschleife bilden, generiert. Dabei steuern positive Elemente (Transkriptionsfaktoren) die Transkription von negativen Elementen (Repressoren), die wiederum mit einer signifikanten Verzögerung ihre eigene Synthese inhibieren und so zu einem permanenten rhythmischen Anstieg und Abfall (Oszillation) von RNA- und Proteinmengen führen [Reppert und Weaver, 2002; Ko und Takahashi, 2006].

Zentrale Bestandteile des circadianen Oszillators in Säugern sind die positiven Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1, die zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-PAS (*Period-Arnt-Single-Minded*)-Transkriptionsfaktoren gehören. CLOCK und BMAL1 heterodimerisieren über ihre PAS-Domänen, binden an cis-regulatorische Enhancer-Sequenzen – die sogenannten E-Box-Elemente mit dem Bindungsmotiv CACGTG – in der Promotorregion ihrer Zielgene und aktivieren deren Transkription. CLOCK und BMAL1 stellen damit die positiven Elemente innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife dar, indem diese als Transkriptionsfaktor-Komplex CLOCK:BMAL1 die Expression der *Period*-Gene (*Per1-3*) und *Cryptochrom*-Gene (*Cry1-2*) aktivieren. Die translatierten PER- und CRY-Proteine bilden im Cytosol miteinander und mit anderen Proteinen (z. B. Casein Kinase 1 $\epsilon/\delta$ ) hochmolekulare Proteinkomplexe. Diese Komplexe translozieren nach einer signifikanten zeitlichen Verzögerung in den Zellkern, um dort als negative Regulatoren durch direkte Protein-Protein-Interaktion den CLOCK/BMAL1- Transkriptionsaktivator-Komplex zu inhibieren. Als Konsequenz wird die Transkription ihrer eigenen Gensynthese



**Abb. 1.2: Vereinfachtes Modell des molekularen Oszillators in Säugern.**

Die Hauptmerkmale des intrazellulären Uhrmechanismus sind interagierende positive (rote Pfeile) und negative (grüne Pfeile) Rückkopplungsschleifen in Kombination mit multiplen posttranslationalen Modifikationen der Uhrproteine. Die Aktivierung der Transkription der Uhrgene *Per* und *Cry* wird initiiert durch Bindung von CLOCK/BMAL1-Heterodimeren an E-Box-Motiven in den jeweiligen Promotoren. Im Cytoplasma komplexieren die translatierten Proteine, unterliegen multiplen posttranslationalen Modifikationen (u. a. durch Kinasen wie CK1 $\epsilon/\delta$ ) und translokieren nach einer essentiellen zeitlichen Verzögerung in den Nucleus zurück, um durch direkte Interaktion mit CLOCK/BMAL1 ihre eigene Synthese zu inhibieren. Diese Autorepression führt zu einer permanenten rhythmischen Oszillation von RNA- und Proteinmengen der Uhrgene. Die positive Rückkopplungsschleife wird über REV-ERB $\alpha$  gesteuert, das selbst einer E-Box-kontrollierten Expression unterliegt und durch zyklische Repression von RRE-Elementen im *Bmal1*-Gen zu der rhythmischen Regulation der *Bmal1*-Transkription beiträgt. Durch kompetitive Bindung und Aktivierung von ROR( $\alpha/\beta/\gamma$ ) wird die Transkription von *Bmal1* zusätzlich moduliert.

unterbunden [Reppert und Weaver, 2002; Tamanini et al., 2005]. Neben E-Boxen sind weitere regulatorische Elemente in Promotorregionen von Uhrgenen identifiziert worden (z. B. D-Boxen und RRE-Elemente), die zu unterschiedlichen Tageszeiten aktiviert werden und damit zu einer differenzierten Regulation der Phase der Uhrgene beitragen [Yamamoto et al., 2004; Ueda et al., 2005; Ukai-Tadenuma et al., 2008].

Zusätzliche Stabilität erhält das circadiane System durch die Verknüpfung mit einer positiven Rückkopplungsschleife, die die Amplitude und Phase der Oszillation reguliert [Preitner et al., 2002; Liu et al., 2008; Bugge et al., 2012]. Dabei wird die rhythmische Transkription von *Bmal1* durch die *orphan nuclear* Rezeptoren ROR $\alpha/\beta/\gamma$  (ROR-Aktivatoren) und REV-ERB $\alpha/\beta$  (REV-ERB-Repressoren) durch kompetitive Bindung an RRE-Elementen (*ROR response elements*) im Promotor von *Bmal1* direkt reguliert. Für eine effiziente repressorische Aktivität assoziiert REV-ERB $\alpha$  zusätzlich mit den Co-Repressoren N-CoR1 und HDAC3 [Feng et al., 2011; Yin und Lazar, 2005]. Die Transkription von *Rev-erba* unterliegt dabei selbst einer circadianen Transkription von CLOCK und BMAL1 durch E-Boxen in der Promotorregion. Während die Einzeldepletion von REV-ERB $\alpha$  und REV-ERB $\beta$  aufgrund von redundanten Funktionen keinen Einfluss auf die Generierung der

circadianen Rhythmik hat, verhindert die Doppeldepletion von REV-ERB $\alpha$ /REV-ERB $\beta$  die Aufrechterhaltung der circadianen Genexpression und unterstreicht die Bedeutung der positiven Rückkopplungsschleife [Cho et al., 2012].

In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue potentielle Uhrkomponenten entdeckt [Zhang et al., 2009; Maier et al., 2009], die auf vielen Ebenen innerhalb der negativen Rückkopplung regulativ wirken und zu einem besseren Verständnis der Komplexität und Dynamik des molekularen Oszillators beigetragen haben. Neben der regulierten Transkription von Uhrgenen sind dabei insbesondere posttranslationale Modifikationen – vor allem Phosphorylierungen von Uhrproteinen durch Kinasen – an der essentiellen zeitlichen Verzögerung zwischen Transkription und Autoinhibition der Uhrgene beteiligt und für die Generierung des circadianen Rhythmus von besonderer Relevanz [Vanselow und Kramer, 2007; Gallego und Virshup, 2007; Reischl und Kramer, 2011].

#### 1.4 DIE BEDEUTUNG POSTTRANSLATIONALER MODIFIKATIONEN FÜR DIE OSZILLATIONSDYNAMIK

Da biochemische Prozesse häufig sehr schnell, innerhalb von Sekunden bis Minuten – und nicht Stunden –, ablaufen, kann die Oszillation mit einer 24 h-Periode nicht alleine durch die rhythmische Regulation auf transkriptioneller Ebene innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife erklärt werden. Für die Generierung des circadianen Rhythmus ist eine enorme zeitliche Verzögerung zwischen Transkription und Autoinhibition der Uhrgene notwendig. Für die präzise spatio-temporale Regulation und Organisation aller regulativen Prozesse innerhalb der molekularen Uhr sind sowohl posttranskriptionelle Prozesse [Cheng und Obrietan, 2007; Cheng et al., 2007], als auch posttranslationale Modifikationen an Uhrproteinen entscheidend. Diese steuern für die circadiane Dynamik essentielle Prozesse wie Modulation der Proteinstabilität durch Degradation, die subzelluläre Lokalisation, die Aktivität von Proteinen und Komplexbildung mit anderen Proteinen.

Zudem gibt es Hinweise in der Literatur, dass eine rhythmische Transkription von Uhrgenen keine grundlegende Voraussetzung für die Generierung des molekularen circadianen Rhythmus sein muss: Es wurde gezeigt, dass die circadiane Uhr von Cyanobakterien *in vitro* auch ohne transkriptionelle Regulation persistiert und nur durch rhythmische

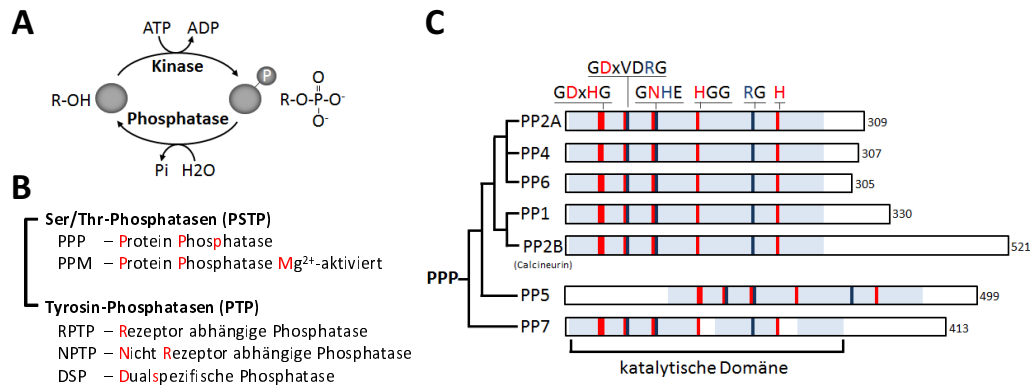
Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen von KaiC in der Anwesenheit von KaiA, KaiB und ATP getrieben werden [Nakajima et al., 2005; Tomita et al., 2005]. Desweiteren gibt es auch deutliche Hinweise in höheren Organismen, da in Säugetierzellen eine konstitutive, ektopische Überexpression von den essentiellen Uhrgenen *mPer1* oder *mPer2* dennoch zu rhythmischen mPER1/mPER2-Proteinabundanz und zu einem normalen circadianen Rhythmus führt [Fujimoto et al., 2006; Nishii et al., 2006]. In *Drosophila* konnte zudem gezeigt werden, dass die konstitutive Überexpression von *dPer* in arrhythmischen PER-Null-Allel-Fliegen den circadianen Rhythmus auf molekularer Ebene und im Verhalten wiederherstellen kann und unter diesen Konditionen sowohl rhythmische PER Proteinlevel als auch die rhythmische nukleäre Akkumulation weiterhin persistieren [Yang und Sehgal, 2001].

Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung von posttranslationalen Modifikationen für die Aufrechterhaltung der Oszillationsdynamik. Zu den bekannten posttranslationalen Prozessen, die bereits mit der circadianen Uhr assoziiert wurden, zählen neben der Sumoylierung, Methylierung, (De-)Acetylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung besonders die reversible Phosphorylierung.

## 1.5 DIE REVERSIBLE PROTEIN-PHOSPHORYLIERUNG

Reversible Phosphorylierungen von Proteinen sind in eukaryontischen Zellen eine der prominentesten posttranslationalen Modifikationen. In nahezu allen zellulären Prozessen – wie beispielsweise Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Genregulation oder Proteintransport – nehmen reversible Phosphorylierungen eine Schlüsselrolle ein. Zudem werden über reversible Phosphorylierungen auch kritische Schritte innerhalb des molekularen Mechanismus der circadianen Uhr reguliert, die für die Aufrechterhaltung einer 24 h-Periode essentiell sind (siehe Kapitel 1.6).

Phosphorylierungen werden von Proteinkinasen katalysiert, indem eine Phosphatgruppe von ATP als Substrat kovalent an eine Hydroxylgruppe einer Aminosäure gebunden wird. Dephosphorylierungsreaktionen hingegen werden von Phosphatasen ausgeführt, welche die Phosphoesterbindung hydrolysieren und damit den Kinase vermittelten Prozess wieder umkehren (siehe Abb. 1.3A). Die Präsenz einer Phosphatgruppe an einem Protein verändert



**Abb. 1.3: Klassifizierung der Phosphatasen und die katalytischen Domänen der PPP-Familie**  
**(A)** Phosphorylierungen werden von Proteinkinasen katalysiert, indem eine Phosphatgruppe ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) von ATP als Substrat kovalent an eine Hydroxylgruppe (-OH) einer Aminosäure gebunden wird. Phosphatasen hydrolysieren diese Phosphoesterbindung und kehren den Kinase vermittelten Prozess um. **(B)** Die Klassifikation der Protein Phosphatasen erfolgt je nach Phosphodonor-Aminosäure in Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphatasen **(C)** Modifiziert nach Shi [2009]. Die PPP-Familie umfasst insgesamt sieben Phosphatasen, deren Aminosäuresequenzen der katalytischen Untereinheiten hoch konserviert sind. Rote und blaue Balken markieren konservierte Sequenzmotive innerhalb der katalytischen Domäne (blau unterlegt).

dessen Ladung und führt im Allgemeinen zu Konformationsänderungen, die sowohl die Eigenschaften als auch die Aktivität des Proteins modifizieren. Im zellulären Proteom sind ca. 30–50 % aller Proteine differentiell phosphoryliert [Cohen, 2002b]. Dabei sind Phosphorylierungen an den Aminosäuren Histidin, Arginin, Lysin, Cystein, Glutamat und Aspartat sehr selten. Die Mehrzahl an Phosphorylierungen treten an Serin-Aminosäuren auf (86,4 %), gefolgt von Threonin- (11,8 %) und Tyrosin-Aminosäuren (1,8 %) [Olsen et al., 2006]. Diese intrazellulären Phosphorylierungsereignisse sind hoch dynamisch, um die Flexibilität einer Zelle zu erhöhen, und damit die schnelle Anpassungsfähigkeit an interne und externe Signale zu gewährleisten. Dabei wird der Phosphorylierungsstatus eines Proteins durch ein fein reguliertes Gleichgewicht von Kinase- und Phosphatase-Aktivitäten bestimmt. Im humanen Genom stehen 518 Proteinkinase codierende Gene (davon 90 Tyr- und 428 Ser/Thr-Kinasen) ca. 140 Phosphatase codierenden Genen gegenüber, darunter existieren nur ca. 30 Ser/Thr-Phosphatasen [Manning et al., 2002; Johnson und Hunter, 2005; Alonso et al., 2004; Shi, 2009; Cohen, 2002a]. Dieses Ungleichgewicht von Ser/Thr-Kinasen und -Phosphatasen im Genom lässt auf eine wenig spezifische Wirkungsweise von Phosphatasen schließen. Während Kinasen als Monomere fungieren und die Spezifität auf der Erkennung bestimmter Konsensusmotive auf den Zielproteinen beruht, existieren katalytische Untereinheiten der

Phosphatasen hauptsächlich in multimeren Proteinkomplexen. Die Komplexbildung einer katalytischen Untereinheit mit weiteren regulatorischen Untereinheiten und Stützproteinen unterliegt zahlreichen externen und internen Stimuli in der Zelle und bestimmt maßgeblich die Aktivität, die subzelluläre Lokalisation und die Substratspezifität der Phosphatase. Die dadurch entstehende tatsächliche Anzahl an funktionalen Phosphatase-Holoenzymen in der Zelle ist mit der Komplexität der spezifischen Kinasen vergleichbar [Gallego und Virshup, 2005; Virshup und Shenolikar, 2009].

**Tab. 1.1: Die PPP-Familie der humanen Ser/Thr-Phosphatasen**

Basierend auf Sequenzhomologien umfasst die PPP-Familie der Ser/Thr-Phosphatasen 7 Phosphatasen mit jeweils einer unterschiedlichen Anzahl an katalytischen Isoformen. Durch die Assoziation mit weiteren regulatorischen Untereinheiten, wird die Anzahl an funktionalen Holoenzymen erhöht.

Ser/Thr-Phosphatase	alternative Bezeichnung	Mol. Masse	katalytische Untereinheit Isoformen	GeneID	regulatorische Untereinheiten
PPP1	PP1	37 kDa	CA CB CC	5499 5500 5501	> 50 diverse Regulatoren
PPP2A	PP2A	36 kDa	CA CB	5515 5516	PPP2R1-5
PP2B	PP3, PPP3, Calcineurin	60 kDa	CA CB CC	5530 5532 5533	CalcineurinB, AKAPs, calmodulin
PPP4	PP4, PPX	35 kDa	C	5531	PPP4R1,R2,SMEK1,SMEK2,R4
PPP5	PP5	60 kDa	C	5536	unbekannt
PPP6	PP6, PP2A-like	35 kDa	C	5537	IGBP1
PPEF	PP7, PPP7, rdgC	75 kDa	CA CB	5475 5470	unbekannt

Die Klassifikation der Protein Phosphatasen erfolgt je nach Phosphodonor-Aminosäure in Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphatasen (siehe Abb. 1.3B). Aufgrund von homologen Aminosäuresequenzen und biochemischen Eigenschaften der katalytischen Untereinheiten wurden die Ser/Thr-Phosphatasen systematisch in zwei Hauptenzymgruppen gegliedert: Die Phosphoprotein-Phosphatasen (PPP) und die Metallionen-abhängigen Phosphatasen (PPM) [Andreeva und Kutuzov, 2001; Honkanen und Golden, 2002; Shi, 2009]. Die PPP-

Familie umfasst insgesamt sieben Enzyme, deren Aminosäuresequenzen der katalytischen Untereinheiten hoch konserviert sind und die damit vermutlich ähnliche katalytische Mechanismen besitzen (siehe Abb. 1.3C und Tab. 1.1). Zu den repräsentativen Vertretern dieser Familie gehören PP1, PP2A, PP4, PP5, PP6, PP2B/Calcineurin und PP7. PP1 und PP2A sind dabei die prominentesten Ser/Thr-Phosphatasen und machen zusammen ca. 90 % der gesamten zellulären Phosphatase-Aktivität aus [Virshup und Shenolikar, 2009; Janssens und Goris, 2001; Janssens et al., 2008; Sontag, 2001; Cohen, 2002a]. Alle bisher für die Regulation des circadianen Uhrmechanismus relevanten Phosphatasen sind Vertreter der PPP-Familie (siehe Kapitel 1.6.2).

## 1.6 DIE RELEVANZ DER PROTEIN-PHOSPHORYLIERUNG IM CIRCADIENEN UHRWERK

Die Protein-Phosphorylierung spielt im circadianen Uhrwerk von *Drosophila*, *Neurospora*, Cyanobakterien und Säugern eine übergreifende Rolle, da sie maßgeblich an der Generierung und Aufrechterhaltung der circadianen Oszillationsdynamik beteiligt ist. Kritische Schritte innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife umfassen beispielsweise die tageszeitspezifische Komplexbildung von Uhrproteinen, die Regulation der subzellulären Lokalisation, die Modulation der Bindungseigenschaften von Transkriptionsfaktoren an die DNA und die Regulation der Proteinstabilität durch einen regulierten proteasomalen Abbau [Gallego und Virshup, 2005].

### 1.6.1 DIE ROLLE DER KINASEN

Die meisten Uhrproteine sind *in vivo* hauptsächlich an Ser/Thr-Aminosäuren phosphoryliert und zeigen ein rhythmisches Phosphorylierungsmuster, wie beispielsweise PER1-3 [Lee et al., 2001], CRY1-2 [Harada et al., 2005], CLOCK [Yoshitane et al., 2009] und BMAL1 [Tamaru et al., 2009]. Dennoch ist bisher über die Dynamik von Phosphorylierungen, die Anzahl, die Lokalisation innerhalb der regulierten Proteine und die Funktion einzelner Phosphorylierungsstellen wenig bekannt. Zahlreiche circadiane Phänotypen lassen sich auf Veränderungen der Kinase-Aktivität oder auf Mutation in den Phosphorylierungsstellen der zentralen Uhrproteine zurückführen. In allen circadianen Modellorganismen konnten



bisher Kinasen identifiziert werden, die in der Regulation der circadianen Uhr involviert sind [Reischl und Kramer, 2011; Gallego und Virshup, 2007; Isojima et al., 2009]. Gute genetische Evidenzen kommen bisher hauptsächlich von Casein Kinase 1 ( $CK1\epsilon/\delta$ ), Casein Kinase 2 (CK2), Glykogen Synthase Kinase  $3\beta$  (GSK3- $\beta$ ) und Mitogen-activated protein Kinase (MAPK) (siehe Tab. 1.2). Darüber hinaus impliziert die Anzahl an multiplen Phosphorylierungsstellen auf Uhrproteinen, dass noch mehrere Kinasen für die präzise Koordination des Säugetier-Oszillators verantwortlich sind. Diese Annahme wird von pharmakologischen und RNAi-Screenings unterstützt, in denen neue Kinasen als putative Regulatoren der circadianen Uhr identifiziert wurden [Yagita et al., 2009; Maier et al., 2009; Robles et al., 2010].

Insbesondere die Phosphorylierung von PER2 und die Relevanz dieser Phosphorylierungen für das circadiane System wurde in den letzten Jahren sehr detailliert untersucht. Mittels massenspektrometrischen Analysen konnten bisher 21 endogene Phosphorylierungsstellen auf mPER2 gefunden werden [Schlosser et al., 2007; Vanselow und Kramer, 2007], die von endogenen Kinasen phosphoryliert werden und innerhalb verschiedener funktioneller Domänen von mPER2 lokalisiert sind. Mutationen, die den Phosphorylierungsstatus von mPER2 und damit die Eigenschaften des Proteins verändern, haben erhebliche Auswirkungen auf die präzise zeitliche und räumliche Regulation innerhalb der negativen Rückkopplung. Dabei sind die Effekte auf die Stabilität, die intrazelluläre Lokalisation und die Aktivität in Abhängigkeit von den spezifischen phosphorylierten Positionen von mPER2 verschieden.

Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Aktivität und Bindung von  $CK1\epsilon/\delta$  an mPER2 für die circadiane Dynamik wichtig ist und sowohl die Stabilität, als auch die subzelluläre Lokalisation der mPER Proteine modifizieren kann [Takano et al., 2004; Akashi et al., 2002; Vielhaber et al., 2000]. Eine wichtige Funktion von  $CK1\epsilon$  ist die tageszeitlich regulierte Induktion der proteasomalen Degradation von mPER2 und damit die Regulation der Proteinabundanz. Dabei fungiert die Phosphorylierung an den Aminosäuren 477-482 als Bindungsstelle für die F-Box Proteine  $\beta$ TRCP1/2, die Teil des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes sind [Eide et al., 2005; Shirogane et al., 2005; Reischl et al., 2007]. Die Hypophosphorylierung von PER2 durch gezielte Mutation an dieser Phosphorylierungsstelle, führt zu einer erhöhten Stabilität von mPER2 und einer langen circadianen Periode. Daneben kann

**Tab. 1.2: Beispiele für die Aktivität von Kinasen und die Funktion verschiedener Phosphorylierungsstellen auf Uhrproteinen im circadianen Oszillator von Säugern**

Protein	Modifikation	Regulator	Funktion	Referenz
PER1	AS 902-916	CK1 $\epsilon$	cytoplasmatische Retention von PER1, maskiert NLS Signal	[Vielhaber et al., 2000]
	AS 653-663	CK1 $\epsilon$	induziert nukleäre Translokation von PER1	[Takano et al., 2004]
PER2	AS 477-482	CK1 $\epsilon$	$\beta$ TRCP-Bindung und PER2 Degradation	[Eide et al., 2005]
	AS 659-678	CK1 $\epsilon/\delta$	nukleäre Retention und Stabilisierung von PER2	[Vanselow et al., 2006]
	unbekannt	GSK-3 $\beta$	induziert nukleäre Lokalisation von PER2	[Iitaka et al., 2005]
	Ser-10, Thr-12, Ser-13, Thr-15	CK2	stabilisiert PER2	[Maier et al., 2009]
	Ser-53	CK2	induziert PER2 Degradation	[Tsuchiya et al., 2009]
PER3	613-626	CK1 $\epsilon/\delta$	induziert PER3 Degradation und nukleäre Translokation	[Akashi et al., 2002]
CRY1	unbekannt	CK1 $\epsilon$	unbekannt, PER2 vermittelt die CK1 $\epsilon$ /CRY1-Bindung	[Eide et al., 2002]
	Ser-247	MAPK/ERK	reduziert inhibitorische Aktivität	[Sanada et al., 2004]
	unbekannt	AMPK	induziert Degradation	[Lamia et al., 2009]
CRY2	Ser-265	MAPK/ERK	reduziert inhibitorische Aktivität	[Sanada et al., 2004]
	Ser-553	GSK-3 $\beta$	induziert Degradation	[Harada et al., 2005]
	Ser-557	DYRK1A	induziert die Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$ an Ser-553, induziert CRY2 Degradation	[Kurabayashi et al., 2010]
CLOCK	Ser-38, Ser-42	unbekannt	verhindert die CLOCK:BMAL1 Bindung und Transaktivierung an E-Boxen	[Yoshitane et al., 2009]
	Ser-427	GSK-3 $\beta$	induziert CLOCK Degradation	[Spengler et al., 2009]
	unbekannt	PKC	stimuliert CLOCK:BMAL1 vermittelte Transkription	[Shim et al., 2007]
BMAL1	unbekannt	CK1 $\epsilon$	stimuliert CLOCK:BMAL1 vermittelte Transkription	[Eide et al., 2002]
	Ser-17, Thr-21	GSK-3 $\beta$	induziert Ubiquitinierung und Degradation	[Sahar et al., 2010]
	Ser-90	CK2	induziert nukleäre Lokalisation von BMAL1	[Tamaru et al., 2009]
	Ser-527, Thr-534, Ser-599	MAPK/ERK	Thr-534 inhibiert CLOCK:BMAL1 vermittelte Transkription	[Sanada et al., 2002]
REVERB $\alpha$	unbekannt	GSK-3 $\beta$	stabilisiert Reverb- $\alpha$ , Lithium antagonisiert den Effekt und führt zur Degradation	[Yin et al., 2006]

CK1 $\epsilon$  aber auch stabilisierende Phosphorylierungsstellen regulieren: Eine Mutation im humanen PER2 [Toh et al., 2001] bzw. in CK1 $\delta$  [Xu et al., 2005], führt zum *familial advance sleep-phase syndrom* (FASPS), dessen physiologische Symptome sich in einer 4 Stunden früheren Schlafphase und einer kürzeren Periode manifestieren. Auf molekularer Ebene führen beide Mutationen zu einer Hypophosphorylierung von PER2. Jedoch weist PER2 eine höhere Sensitivität gegenüber dem CK1 $\epsilon/\delta$ -vermitteltem proteasomalen Abbau auf und ist trotz der verminderten Phosphorylierung instabiler. Der stabilisierende Effekt der Phosphorylierung in der FASPS-Region ist dabei auf eine verstärkte Kernretention des PER2-Proteins und einem frühzeitigen Transport des inhibitorischen Komplexes aus dem Zellkern zurückzuführen [Vanselow et al., 2006].

### 1.6.2 DIE ROLLE DER PHOSPHATASEN

Über die Wirkungsweise und Bedeutung von Phosphatasen im circadianen Uhrwerk – vor allem in der Säugern – ist bisher wenig bekannt. Eine wichtige Funktion der Proteinphosphorylierung ist der induzierte proteasomale Abbau von Uhrproteinen, wie beispielsweise die durch CK1 $\epsilon/\delta$  vermittelte Degradation von mPER2. Wenn Phosphorylierung generell destabilisierend auf ein Zielprotein wirkt und irreversibel wäre bis das Protein abgebaut ist, wäre eine Dephosphorylierungsreaktionen nicht unbedingt notwendig. Wieso wäre also die Dephosphorylierung von Bedeutung? Ein Grund ist, dass nicht nur destabilisierende sondern auch stabilisierende Phosphorylierungsstellen an Uhrproteinen identifiziert wurden (siehe Kapitel 1.6.1). Zudem reguliert die Phosphorylierung nicht nur die Proteinstabilität, sondern ist auch in vielen anderen Prozessen wie z. B. dem regulierten Kernimport/-export oder die Aktivität des Transkriptionsaktivorkomplexes beteiligt [Gallego und Virshup, 2007]. Aus dem komplexen Netzwerk und Zusammenspiel von Kinase- und Phosphatase-Aktivitäten könnte eine präzise, zeitliche Regulation des Phosphorylierungsstatus von Uhrproteinen resultieren, die sehr wahrscheinlich für die Generierung und Aufrechterhaltung einer robusten Oszillationsdynamik relevant ist. Interessant ist auch, dass für einige Kinasen nur eine konstitutive Proteinabundanz innerhalb des circadianen Zyklus nachgewiesen werden konnte, die aber dennoch zu einem rhythmischen Phosphorylierungsmuster am Zielprotein führt (z. B. mCK1 $\epsilon$ , DBT und SGG). Drei Szenarien sind denkbar, wie eine rhythmische

Phosphorylierung trotz konstitutiver Kinase-Abundanz generiert werden kann:

1. Die Kinase-induzierte Phosphorylierung auf einem Zielprotein ist konstitutiv, aber eine zyklisch aktive Phosphatase führt zu einem rhythmischen Phosphorylierungsmuster auf dem Zielprotein.
2. Die Aktivität der Kinase unterliegt selbst der Regulation durch reversible Phosphorylierung und wird durch die Aktivität einer rhythmischen Phosphatase gesteuert, was unabhängig von der konstitutiven Expression der Kinase zu einem rhythmischen Phosphorylierungsmuster auf dem Zielprotein führt.
3. Trotz konstitutiver Expression wird die subzelluläre Lokalisation der Kinase (im Cytoplasma oder Nucleus) phasenspezifisch reguliert. Dadurch kann ein Zielprotein auch nur dann phosphoryliert werden, wenn die Kinase und das Zielprotein in einem Kompartiment co-lokalisiert sind. Dies kann zu einem rhythmischen Phosphorylierungsmuster am Zielprotein führen.

In verschiedenen Modellorganismen konnte bis heute einigen Vertretern der Ser/Thr-Phosphatasen – darunter Protein Phosphatase 1 (PP1), Protein Phosphatase 2A (PP2A), Protein Phosphatase 4 (PP4) und Protein Phosphatase 5 (PP5) – eine spezifische Funktion in der Regulation der circadianen Uhr zugeschrieben werden (siehe Tab. 1.3).

### NEUROSPORA

Die drei Hauptkomponenten des circadianen Oszillators in *Neurospora* sind FREQUENCY (FRQ), WHITE COLLAR-1 (WC-1) und WHITE COLLAR-2 (WC-2) [Loros und Dunlap, 2001], deren Phosphorylierungsstatus für die Funktion der Komponenten und die Dynamik der Oszillation eine wesentliche Rolle spielt. Einige Proteinkinasen - darunter CK1 und CK2 – phosphorylieren FRQ und führen zu dessen proteasomalem Abbau. Eine Hypophosphorylierung von FRQ, die entweder durch Mutationen in der FRQ Phosphorylierung oder durch Depletion der relevanten Kinasen induziert wird, resultiert in einer Stabilisierung von FRQ und zu langen Perioden [Cha et al., 2011]. Sowohl Protein Phosphatase 1 (PP1) als auch Protein Phosphatase 2A (PP2A) sind essentielle Regulatoren der circadianen

**Tab. 1.3: Funktion von Ser/Thr-Phosphatasen in der circadianen Uhr verschiedener Modellorganismen**

Spezies	Phosphatase	Zielprotein	Funktion	<i>loss-of-function</i> Phänotyp	Referenz
Drosophila	PP1	TIM	Stabilisierung	lange Periode	[Fang et al., 2007]
	PP2A	PER	Stabilisierung	lange Periode, Arrhythmie	[Sathyanarayanan et al., 2004]
		CLOCK	Stabilisierung	n.d.	[Kim und Edery, 2006]
Neurospora	PP1	FRQ	Stabilisierung	kurze Periode, vorgezogene Phase	[Yang et al., 2004]
	PP2A	FRQ	unbekannt	lange Periode, niedrige Amplitude	[Yang et al., 2004]
		WCC	antagonisiert die CK1/CK2 induzierte Phosphorylierung, aktiviert DNA-Bindung	lange Periode, niedrige Amplitude von <i>frq</i> mRNA und Protein	[Schafmeier et al., 2005] [Schafmeier et al., 2008]
	PP4	FRQ	Stabilisierung	kurze Periode, niedrige Amplitude	[Cha et al., 2008]
		WCC	Aktivierung der nukleären Translokation	kurze Periode	[Cha et al., 2008]
Mammalia	PP1	PER2	Stabilisierung, antagonisiert die CK1 $\epsilon$ induzierte Phosphorylierung	n.d.	[Gallego et al., 2006]
			antagonisiert die CK1 $\epsilon$ / $\delta$ induzierte Phosphorylierung	kurze Periode	[Lee et al., 2011]
			reguliert die nukleäre Akkumulation	lange Periode	[Schmutz et al., 2011]
	PP5	CK1 $\epsilon$ /CRY	Destabilisierung, reduzierte Transaktivierung	keine Veränderung	[Wallach et al., 2013]
			antagonisiert die inhibitorische Autophosphorylierung von CK1 $\epsilon$ , CRY inhibiert die PP5 Aktivität	niedrige PER1/2 Amplitude	[Partch et al., 2006]

Uhr von *Neurospora*, die auf verschiedenen Ebenen der molekularen Rückkopplungsschleife angreifen und den unterschiedlichen Kinase-Aktivitäten dynamisch entgegenwirken.

Protein Phosphatase 1 (PP1) dephosphoryliert FRQ *in vitro*. In einer Mutante, in der die katalytische Untereinheit von PP1 depletiert ist, ist die circadiane Phase verfrüht und die Periode kurz [Yang et al., 2004]. Auf molekularer Ebene kann dieser Effekt mit einer schnelleren Degradation von FRQ durch Hyperphosphorylierung erklärt werden.

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass FRQ *in vitro* durch Protein Phosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert wird. *In vivo* beeinflusst eine Mutation in einer regulatorischen Untereinheit von PP2A – die sog. *rgb-1* Mutante – das Phosphorylierungsmuster von FRQ, im Gegensatz zu der Funktion von PP1 konnte aber keine veränderte FRQ Stabilität festgestellt werden. Allerdings sind in der *rgb-1* Mutante sowohl die *frq* mRNA als auch Proteinlevel von FRQ erniedrigt und es zeigt sich eine veränderte Oszillationsdynamik mit einer langen Periode

und einer schwachen Amplitude. PP2A übernimmt in der circadianen Uhr von *Neurospora* eine duale Funktion, indem es zusätzlich auch den Phosphorylierungsstatus von WCC reguliert. Während FRQ rhythmisch die Phosphorylierung und damit Deaktivierung von WCC fördert, führt die PP2A-Aktivität zu einer Dephosphorylierung und Aktivierung von WCC. Die FRQ-abhängige Deaktivierung und PP2A-abhängige Aktivierung verläuft dabei innerhalb von Sekunden und ist an die subzelluläre Lokalisation des Transaktivatorkomplexes gekoppelt [Schafmeier et al., 2005, 2008].

Eine funktionale Rolle von Protein Phosphatase 4 (PP4) ist bisher ausschließlich in der circadianen Uhr von *Neurospora* beschrieben. Die genetische Depletion von PP4 führt zu einer kurzen Periode mit einer schwachen Amplitude. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass PP4c einerseits die FRQ Phosphorylierung reguliert und dabei stabilisierend wirkt, andererseits aber auch durch Dephosphorylierung von WCC die nukleäre Akkumulation und die Bindung an die DNA begünstigt [Cha et al., 2008].

### DROSOPHILA

Eine rhythmische Phosphorylierung der zentralen Uhrkomponenten PERIOD (PER) und TIMELESS (TIM) spielt auch im molekularen Mechanismus der circadianen Uhr von *Drosophila* eine kritische Rolle. Die Kinasen DOUBLETIME (DBT), SHAGGY (SGG) und CK2 wurden bereits mit der circadianen Uhr von *Drosophila* assoziiert, da sie sowohl die Proteinstabilitäten als auch die nukleäre Translokation von PER und TIM regulieren können und damit einen Einfluss auf die Periodenlänge haben [Harms et al., 2003; Akten et al., 2003; Lin et al., 2002]. Die posttranslationale Regulation von PER und TIM erfordert neben den Kinase-Aktivitäten aber auch die Aktivität von Protein Phosphatase 1 (PP1) und Protein Phosphatase 2A (PP2A).

PP1 ist dabei hauptsächlich in der Regulation der rhythmischen Proteinabundanz von TIM beteiligt [Fang et al., 2007]. Fliegen, die durch Überexpression des endogenen PP1-Inhibitors NIPP1, eine reduzierte PP1-Aktivität aufweisen, zeigen im Verhaltensrhythmus eine lange Periode und eine reduzierte Amplitude. Auf molekularem Level konnte demonstriert werden, dass die spezifische Inhibition der PP1-Aktivität zu einer Destabilisierung von TIM führt. Da die PER Stabilität von der Präsenz von TIM abhängig ist, führt

dies zusätzlich zu einer starken Abnahme der PER-Abundanz. Es wird damit postuliert, dass Dephosphorylierung von TIM durch PP1 vor dem proteasomalen Abbau schützt und dadurch die Akkumulation von TIM/PER-Komplexen zulässt. Die stabilisierten TIM/PER-Komplexe sind dann Substrat für weitere Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse durch SGG und PP2A. So wurde gezeigt, dass PP2A bei der Regulation der PER Proteininstabilität und der nukleären Akkumulation involviert ist [Sathyanarayanan et al., 2004]. Die Inhibition der PP2A Aktivität durch Überexpression einer dominant-negativen Mutante der katalytischen Untereinheit (mts) führt zu einer Reduktion der PER Proteinabundanz und auf Verhaltenesebene zu einer langen Periode bzw. Arrhythmie. Zwei rhythmisch exprimierte regulatorische Untereinheiten von PP2A, TWINS (TWS) und WIDERBORST (WDB), spielen bei der Regulation der dPER Stabilität eine essentielle Rolle. Da bisher keine rhythmischen Aktivitäten von den relevanten Kinasen beschrieben sind, wird vermutet, dass neben einer circadianen Transkription von *Per*, rhythmische PER Proteinabundanzen durch die zyklische Aktivität von PP2A durch tageszeitspezifische Assoziation mit den regulatorischen Untereinheiten generiert werden.

Ein weiteres Zielprotein von PP2A ist CLOCK (CLK), dass durch DBT phosphoryliert und destabilisiert wird [Kim und Edery, 2006]. Daraus resultiert eine Inhibition der CLK-abhängigen Transaktivierung von circadianen Promotorelementen. Die Interaktion mit PP2A antagonisiert die DBT-induzierte Hyperphosphorylierung von CLK und führt dabei zu einem dynamischen Gleichgewicht zwischen hypo- und hyperphosphorylierten Spezies. Es wird vermutet, dass diese Balance CLK gegenüber stochastischen Fluktuationen stabilisiert.

## MAMMALIA

Zahlreiche Untersuchungen liefern Hinweise, dass die Phosphorylierung von PER2 ein dynamischer Prozess ist, indem sowohl Kinase- als auch Phosphatase-Aktivitäten an der Regulation der Stabilität beteiligt sind.

In einem Zellkultur basierten Ansatz in HEK293 Zellen konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibition mit Calyculin A– einem zellpermeablen, unspezifischen Inhibitor von Serin/Threonin-Phosphatasen– zu einer Hyperphosphorylierung und Polyubiquitinierung von mPER2 und damit zu einem beschleunigten proteasomalen Abbau führt

[Eide et al., 2005]. Dabei ist ein mPER2-Fragment, welches nur die CK1 $\epsilon$ -Bindungsdomäne umfasst, ausreichend um die Calyculin A vermittelte Proteindegradation zu induzieren.

In Fibroblasten führt die Behandlung mit Calyculin A zu einer schnellen Hyperphosphorylierung von mPER und einer dosisabhängigen Verkürzung der Periode [Lee et al., 2011]. *In vivo* interagiert Protein Phosphatase 1 (PP1) mit mPER2 und besitzt dabei eine stärkere Affinität gegenüber hyperphosphorylierten mPER2-Spezies. Die Reduktion der PP1-Aktivität durch Überexpression von dominant-negativen PP1-Mutanten (D95N bzw. D64N) führt zu hyperphosphoryliertem mPER2 und zu einer drastischen Reduktion der Magnitude mit einer 3-4 h verkürzten Periode. Es wird postuliert, dass die mPER2 Phosphorylierung durch ein kontrolliertes Gleichgewicht zwischen CK1 $\epsilon$ - und PP1-Aktivität bestimmt wird. Neben der veränderten Oszillationsdynamik führt die Überexpression einer dominant-negativen Mutante von PP1 (D95N), als auch die ektopische Expression von PP1-Inhibitoren (I-1 und I-2) zu einem beschleunigten proteasomalen Abbau von mPER2 und damit zu einer Verkürzung der Halblebenszeit [Gallego et al., 2006]. Damit ist PP1 direkt an der Regulation der Stabilität von mPER beteiligt und reguliert negativ die durch CK1 $\epsilon$  induzierte Phosphorylierung und subsequente Degradation von mPER2.

Neben der Regulation der PER2 Stabilität, gibt es auch Hinweise, dass die intrazelluläre Lokalisation von mPER2 und die durch Licht induzierte Phasenverschiebung der Oszillation in SCN Neuronen von Mäusen (Entrainment-Verhalten) durch PP1 reguliert wird [Schmutz et al., 2011]. Die Reduktion der PP1-Aktivität, entweder durch RNAi vermittelte Depletion oder durch Überexpression eines spezifischen Inhibitors (I-1), führt sowohl auf Verhaltens-ebene von Mäusen als auch in oszillierenden Zellen zu einer verlängerten Periode. Dabei wird angenommen, dass die veränderte Oszillationsdynamik durch eine verstärkte Akkumulation von *mPer1* und *mPer2* auf molekularer Ebene bedingt ist.

Als ein weiteres Zielprotein von PP1 wurde BMAL1 identifiziert [Wallach et al., 2013]. In der murinen Leber bindet PP1CA tageszeitabhängig an BMAL1 und deutet damit auf eine zeitabhängige Modulation der CLOCK/BMAL1 Funktion hin. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PP1CA die CLOCK/BMAL1-abhängige Transaktivierung an E-Boxen negativ reguliert und die Proteindegradation von BMAL1 beschleunigt. Es wird postuliert, dass PP1CA ein dynamischer Regulator der BMAL1 Funktion ist, in dem vermutlich PP1CA am Ende des circadianen Zyklus BMAL1



an einer potentiell stabilisierenden Phosphorylierungsstelle dephosphoryliert und damit zu einem verstärkten proteasomalen Abbau und einer reduzierten Transaktivierung führt.

Eine weitere funktionale Rolle im circadianen Uhrmechanismus spielt Protein Phosphatase 5 (PP5), die sowohl mit CK1 $\epsilon$  als auch mit mCRY1/2 an verschiedenen funktionellen Domänen interagiert [Partch et al., 2006]. Dabei wird durch Dephosphorylierung der autoinhibitorischen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von CK1 $\epsilon$  die Kinase-Aktivität positiv reguliert. Dieser Effekt wird durch nicht-kompetitive Bindung von mCRY inhibiert. Die Expression einer dominant-negativen Mutante reduziert die CK1 $\epsilon$  vermittelte mPER2 Phosphorylierung und eine genetische Inhibition von PP5c mittels RNAi führt in oszillierenden humanen Fibroblasten zu einer geschwächten Amplitude von mPER1 und mPER2-Proteinabundanz.

## 1.7 ZIELSTELLUNG

Posttranslationale Modifikationen – besonders die reversible Phosphorylierung – spielen eine essentielle Rolle in der Generierung und Aufrechterhaltung von circadianen Rhythmen. Um die Komplexität des circadianen Uhrwerks und das Zusammenspiel der zugrunde liegenden geschwindigkeitsbestimmenden, regulatorischen Prozesse besser zu verstehen, ist es erforderlich nach neuen Uhrkomponenten zu suchen und bestehende Arbeitsmodelle umfassend zu erweitern. Ein neuer Aspekt ist hierbei die Frage nach der Relevanz von Phosphatasen, die in Säugern bisher nur unzureichend untersucht wurde. Insbesondere sind Phosphatasen aus zwei Gründen von Interesse: Zum Einen sind posttranslationale Mechanismen zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert und in *Drosophila* und *Neurospora* wurde den Phosphatasen bereits eine wichtige funktionelle Rolle zugeschrieben. Zum Anderen, häufen sich in der Literatur die Hinweise, dass Oszillationen in Säugern – ähnlich wie in Cyanobakterien – auch durch Abwesenheit einer rhythmischen Transkription getrieben werden können: So könnten beispielsweise Kinasen, die in ihrer Proteinabundanz nicht oszillieren, für die aber dennoch ein rhythmisches Phosphorylierungsmuster auf deren Zielproteinen nachgewiesen werden konnte, alternativ auch das funktionelle Zusammenspiel mit einer zyklisch aktiven Phosphatase erfordern.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine systematische und funktionelle Charakterisierung von Ser/Thr-Phosphatasen der PPP-Familie<sup>1</sup> im molekularen Uhrwerk von Säugern, da bisher ausschließlich Protein-Phosphatasen dieser Untergruppe mit der circadianen Uhr anderer Modellorganismen regulativ assoziiert sind (siehe Kapitel 1.6.2). Folgende Aufgabenstellungen standen im Vordergrund:

1. Es sollte ein vollständiges Screening nach Vertretern der PPP-Familie der humanen Ser/Thr-Phosphatasen, die die circadiane Dynamik beeinflussen, durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollten in einer humanen Reporterzelllinie, in denen die endogene Uhr über eine durch einen circadianen Promotor getriebene rhythmische Luciferase-Aktivität ausgelesen werden kann, mittels RNAi Technologie systematisch alle annotierten katalytischen Untereinheiten dieser Ser/Thr-Phosphatasen einzeln

---

<sup>1</sup>Basierend auf Sequenzhomologien umfasst die PPP-Familie der Ser/Thr-Phosphatasen sieben Protein-Phosphatasen (PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 und PP7) mit jeweils einer unterschiedlichen Anzahl an katalytischen Isoformen (siehe Kapitel 1.5)

depletiert und untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die Herunterregulation der entsprechenden Gene einen Einfluss auf die Oszillationsdynamik (v. a. auf die Parameter Periode, Amplitude und Dämpfung) haben.

2. Anschließend sollte der *loss-of-function* Phänotyp von potentiell interessanten Phosphatase Kandidaten mit sensitiveren Messmethoden in einem größeren Maßstab validiert und ein regulativer Mechanismus im circadianen Uhrwerk untersucht werden. Die biologische Funktion im molekularen Uhrwerk sollte dabei mittels molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden im Hinblick auf die folgenden Fragen untersucht werden:

- a) Inwiefern beeinflusst eine veränderte Gendosis der Phosphatase die Oszillationsdynamik?
- b) Moduliert eine veränderte Gendosis der Phosphatase die rhythmische Expression der Uhrgene?
- c) Interagiert die Phosphatase mit essentiellen Uhrproteinen?
- d) Durch welchen molekularen Mechanismus kann die Phosphatase die circadiane Dynamik beeinflussen?



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 BEZUGSQUELLENNACHWEIS

Alle Chemikalien, Life Science-Produkte und Verbrauchsmaterialien wurden von den folgenden Firmen bezogen (siehe Tab. 2.1).

**Tab. 2.1:** Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Firma	Hauptsitz
ABgene	Schwerte, Deutschland
Addgene	Cambridge, Massachusetts, USA
Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
BD Biosciences	Franklin Lakes, New York, USA
Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Fermentas	St. Leon, USA
Life Technologies™	Carlsbad, California, USA
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Eurofins MWG Operon	Ebersberg, Deutschland
New England Biolabs GmbH	Ipswich, Massachusetts, USA
Novus Biologicals	Littleton, USA
P.J.K GmbH	Kleinblittersdorf, Deutschland
Promega	Mannheim, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Santa Cruz, USA
SARSTEDT	Nümbrecht, Deutschland
Schleicher und Schuell	Brentford, Middlesex, UK
Sigma-Aldrich®	Taufkirchen, Deutschland
Source BioScience	Nottingham, UK
Stratagene	La Jolla, California, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Qiagen	Venlo, Provinz Limburg, Niederlande

## 2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.2.1 MEDIEN- UND PUFFERFORMULIERUNGEN

LB-Medium (autoklaviert)	10 g NaCl 10 g Bactotrypton 5 g Hefe-Extrakt ad 1 l <i>aqua dest.</i>
LB-Agar Platten	1 l LB-Medium 10–15 g Agar (BD Biosciences) sterilisieren
LB-Selektionsmedien	1 l LB-Medium LB-Ampicillin 100 µg/ml LB-Kanamycin 100 µg/ml
50 x TAE	2 M Tris-Base 50 mM EDTA 1 M 100 % Essigsäure pH 8,5
1 x TAE	20 ml 50 x TAE ad 1 l <i>aqua dest.</i>
Agarose-Gele	1–2 % Agarose (Carl-Roth GmbH) in 1 x TAE 5 µl 1 %ige EtBr-Lösung (Carl-Roth GmbH) auf 100 ml Agarose-Gel
6 x DNA-Ladepuffer	30 % Glycerin 1 mM EDTA 0,25 % Bromphenolblau

### 2.2.2 GATEWAY®-KLONIERUNG

Für die Herstellung von pLenti6- und pFlag-CMV-D11 bzw. pMyc-CMV-D12 basierten Expressionskonstrukten zur ektopischen Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen wurde die Gateway® Cloning Technologie (Life Technologies™) verwendet. Für die Gateway®-Klonierung wurden zunächst pro Ansatz 75 ng pENTR-Vektor, 75 ng pDEST-Vektor (siehe Tab. 2.3) und 3,6 µl H<sub>2</sub>O gemischt und anschließend 1 µl LR Clonase™ II Enzym (Life Technologies™) zugefügt. Der Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert. Anschließend

wurde 0,5 µl Proteinase K (Life Technologies™) zugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte in kompetente Bakterienstämme (2.2.3).

### 2.2.3 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Die Transformation von Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen der Gateway®-Klonierung erfolgte in den *E.coli* Bakterienstämmen DH10β (Life Technologies™) oder XL1 Blue (Stratagene). Es wurden 200 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, danach wurde die Plasmid-DNA (ca. 100 ng oder der gesamte Ligationsansatz (siehe 2.2.2) hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Der Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 90 sec bei 42 °C. Nach einer 10 minütigen Abkühlphase auf Eis wurden die Zellen mit 800 µl LB-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C und 700 rpm geschüttelt. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin jeweils in der Endkonzentration 100 µg/ml) ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 2.2.4 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde für kleine Ausbeuten (3 ml Übernachtskultur) der Mini-Kit (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) und für größere Ausbeuten (50 ml Übernachtskultur) der Midi-Kit (QIAprep Spin Midiprep Kit, Qiagen) entsprechend der jeweiligen Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde entweder in 50 µl HPLC-H<sub>2</sub>O eluiert (Mini-Format) oder in 200 µl HPLC-H<sub>2</sub>O resuspendiert (Midi-Format). Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration und -Reinheit photometrisch bei <sup>260</sup>/<sub>280</sub> nm bestimmt (NanoDrop, Roche) und die korrekte Plasmid-Identität mittels Restriktionsverdau analysiert (siehe 2.2.6).

### 2.2.5 AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden 1–2 % ige Agarose-Gele durch Aufkochen der gewünschten Agarosemenge in 1 x TAE hergestellt. Nach einer kurzen Abkühlphase der

Agarose auf ca. 60 °C wurde 0,05 % Ethidiumbromid (Carl-Roth GmbH) zugesetzt und in die Gelkammer gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt, mit 1 x TAE übergossen und der Gelkamm gezogen. Die mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert, als Größenmarker diente 5 µl 1 kb- und 100 bp DNA-Marker (New England Biolabs). Die Elektrophorese wurde bei 100 V bis zur gewünschten Auftrennungslänge durchgeführt. Die Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Licht (ChemoCam, Intas).

### 2.2.6 RESTRIKTIONSVERDAU

Standardmäßig wurde nach jeder DNA-Extraktion aus Bakterienkulturen (siehe 2.2.4) eine qualitative Analyse der Plasmid-DNA durchgeführt. Der Restriktionsverdau erfolgte mit dem Restriktionsenzym *BsrGI* unter Verwendung des spezifischen Reaktionspuffers (New England Biolabs) nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Pro Restriktionsansatz wurden 0,5 µl Plasmid-DNA (ca. 150–500 ng), 0,3 µl *BsrGI* (200 U/µl), 1 µl NE2 Puffer, 1 µl 10 x BSA (10 mg/ml) und 7 µl HPLC-H<sub>2</sub>O pipettiert. Die Ansätze wurden 1,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 2 µl 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Die generierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (siehe 2.2.5).

### 2.2.7 SEQUENZSPEZIFISCHE MUTAGENESE

Zur Herstellung der katalytisch inaktiven Mutante von humaner PP4c (PP4c mut) wurde die Aminosäure Arginin an Position 236 zu Leucin mutiert. Die sequenzspezifische Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange™ Mutagenese Kits von Stratagene durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Mutagenese-Primer wurden entsprechend den Kriterien des Kits hinsichtlich einer optimalen Schmelztemperatur, Basenlänge und GC-Gehalt konzipiert (siehe Tab. 2.2). Für die *in vitro* Reaktion wurden 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 50 ng DNA Plasmid (pENTR™ 221/hPP4c), 125 ng Oligonukleotid Primer 1, 125 ng Oligonukleotid Primer 2 und 1 µl dNTP Mix eingesetzt und mit H<sub>2</sub>O auf ein finales Volumen von 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Reaktion 1 µl *PfuTurbo* DNA Polymerase (2,5 U/µl) hinzugefügt. Die Ansätze wurden zunächst 30 sec auf 95 °C erhitzt, anschließend in 16 Zyklen jeweils sequentiell für 30 sec bei 95 °C, 1 min bei 55 °C und 5 min bei 68 °C (1 min/kb



Plasmidlänge) inkubiert. Die Ansätze wurden für 2 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde 0,5 µl *Dpn I* Restriktionsenzym (20 U/µl) zugegeben und für 1 h bei 95 °C inkubiert. Dieser Schritt diente zum Abbau des parentalen, nicht mutierten DNA-Stranges. Anschließend wurden 200 µl kompetente XL1-Blue *E.coli* mit 4 µl der *Dpn I* behandelten DNA nach Standardprotokoll transformiert (siehe 2.2.3).

**Tab. 2.2:** Mutagenese-Primer zur Herstellung der Mutante PP4c mut

Oligonukleotid	Sequenz
<b>PP4c/R236L</b>	
Primer 1	(5'–3') CATTGACATGATCTGCCTTGCCCACTGCTGGTGATG
Primer 2	(5'–3') CATCACCAGGTGGTGGGCAAGGCAGATCATGTCAATG

### 2.2.8 EXPRESSIONSVEKTOREN

Die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren wurden entweder eigens mittels Gateway®-Klonierung der entsprechenden pENTR™ und pDEST™-Vektoren (siehe 2.2.2) generiert oder bereits im Vorfeld von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe AG Kramer (Inst. für Med. Immunologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin) hergestellt (siehe Tab. 2.3).

### 2.2.9 RNA-EXTRAKTION

Die Isolation von RNA aus diversen verwendeten eukaryontischen Zelllinien wurde mit dem kommerziell erhältlichen PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies™) nach Herstellerangaben durchgeführt. Von den Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und mit 1–2 ml warmen 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 350 µl Lysispuffer und 1% β-Mercaptoethanol lysiert. Die Lysate wurden in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt und mit Hilfe einer Spritze und Kanüle durch mehrmaliges Auf- und Abziehen vollständig homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte nach Herstellerangaben. Ein zusätzlicher 15-minütiger Inkubationsschritt mit PureLink® DNase (Life Technologies™) auf der Extraktions-Säule diente dem Verdau genomischer DNA. Die RNA wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert und bei 80 °C gelagert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration

Tab. 2.3: Basis- und Expressionsvektoren

Basisvektoren	Verwendung	Herkunft
<b>pDEST™-Vektoren</b>		
pDEST™ 26	Gateway®-Klonierung	Life Technologies™
pLenti6/V5-DEST™	Gateway®-Klonierung	Life Technologies™
pMyc-CMV-D12	Gateway®-Klonierung	Addgene
pFlag-CMV-D11	Gateway®-Klonierung	Addgene
<b>pENTR™-Vektoren (ORF Shuttle Clone)</b>		
pENTR™ 221/hPp4c (IOH4082)	Gateway®-Klonierung	Source BioScience
pENTR™ 221/hPp4c mut	Gateway®-Klonierung	Sabrina Klemz
pENTR™ 221/hHdac3 (IOH4233)	Gateway®-Klonierung	Source BioScience
pENTR™ 221/hPp2r2b	Gateway®-Klonierung	AG AG Wanker
pENTR™ 221/hPp2ca	Gateway®-Klonierung	AG AG Wanker
pENTR™ 221/hPp2cb	Gateway®-Klonierung	AG Wanker
pENTR™ 221/hPp2r1a	Gateway®-Klonierung	AG Wanker
pENTR™ 221/hPp2r1b	Gateway®-Klonierung	AG Wanker
pENTR™ 221/mPer1	Gateway®-Klonierung	AG Wanker
pENTR™ 221/mCry1	Gateway®-Klonierung	AG Wanker
<b>andere Vektoren</b>		
psPAX	Virusproduktion	Addgene
pMD2G	Virusproduktion	Addgene
Expressionsvektoren	Verwendung	Herkunft
pGL3-E6S ( <i>E-Box-Luc</i> )	E-Box-Transaktivierung	AG Kramer
pAB-puro-SV40-RRE ( <i>RRE-Luc</i> )	RRE-Transaktivierung	AG Kramer
pHRL-SV40 ( <i>Renilla-Luc</i> )	E-Box und RRE-Transaktivierung	AG Kramer
pDEST™ 26/ <i>LacZ</i>	E-Box und RRE-Transaktivierung	AG Kramer
pDEST™ 26/ <i>mPer2</i>	E-Box-Transaktivierung	AG Kramer
pDEST™ 26/ <i>mCry1</i>	E-Box-Transaktivierung	AG Kramer
pDEST™ 26/ <i>mClock</i>	E-Box-Transaktivierung	AG Kramer
pDEST™ 26/ <i>mBmal1</i>	E-Box-Transaktivierung	AG Kramer
pDEST™ 26/hPp4c	E-Box und RRE-Transaktivierung	Sabrina Klemz
pDEST™ 26/hPp4c mut	E-Box und RRE-Transaktivierung	Sabrina Klemz
pDEST™ 26/hHdac3	RRE-Transaktivierung	Sabrina Klemz
pDEST™ 26/ <i>mRev-erba</i>	RRE-Transaktivierung	AG Kramer
pLenti6/hRorγ	RRE-Transaktivierung	AG Kramer
pDEST51/ <i>mPer2-V5</i>	Stabilität	AG Kramer
pLenti6/hPp4c	Oszillationsdynamik/mRNA	Sabrina Klemz
pLenti6/hPp4c mut	Oszillationsdynamik	Sabrina Klemz
pLenti6/hPp2r2b	Oszillationsdynamik	Sabrina Klemz
pLenti6/ <i>tGfp</i>	Oszillationsdynamik/mRNA	AG Kramer
pFlag-CMV-D11/ <i>mPer1</i>	Protein-Interaktion	Sabrina Klemz
pFlag-CMV-D11/ <i>mPer2</i>	Protein-Interaktion	AG Kramer
pFlag-CMV-D11/ <i>mCry1</i>	Protein-Interaktion	Sabrina Klemz
pFlag-CMV-D11/ <i>mCry2</i>	Protein-Interaktion	AG Kramer
pFlag-CMV-D11/ <i>mBmal1</i>	Protein-Interaktion	AG Kramer
pFlag-CMV-D11/hPp4c	Protein-Interaktion	Sabrina Klemz
pMyc-CMV-D12/hPp4c	Protein-Interaktion	Sabrina Klemz
pMyc-CMV-D12/hRev-erba	Protein-Interaktion	AG Kramer
pMyc-CMV-D12/hPp2r2b	Protein-Interaktion, Stabilität	Sabrina Klemz
pMyc-CMV-D12/hPp2ca	Protein-Interaktion	Sabrina Klemz
pMyc-CMV-D12/hPp2r1b	Protein-Interaktion	Sabrina Klemz
pMyc-CMV-D12/ <i>LacZ</i>	Protein-Interaktion, Stabilität	Sabrina Klemz
pGIPz/hHdac3 (V2LHS_53152)	RNAi mRNA-Depletion	Thermo Scientific
pGIPz/mPp4c 1 (V3LMM_495931)	RNAi mRNA-Depletion	Thermo Scientific
pGIPz/mPp4c 2 (V3LMM_495927)	RNAi mRNA-Depletion	Thermo Scientific
pGIPz/ <i>non-silencing</i> (Kontroll-shRNA)	RNAi mRNA-Depletion	Thermo Scientific

weitere pGIPz shRNA-Konstrukte zur mRNA-Depletion von katalytischen Untereinheiten humaner Ser/Thr-Phosphatasen, sowie den regulatorischen Untereinheiten von PP4c und PP2A sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Anhang Tab. 1, Tab. 3 und Tab. 4)

AG Prof. Dr. Achim Kramer, Inst. für Med. Immunologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin  
AG Prof. Dr. Erich Wanker, Max Delbrück Zentrum für molekulare Medizin, Berlin

in den Eluaten erfolgte photometrisch bei 260 nm am NanoDrop (Roche).

### 2.2.10 REVERSE TRANSKRIPTION

Pro Ansatz wurde 2 µg isolierte Gesamt-RNA (siehe 2.2.9) mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. In 50 µl-Ansätzen wurden die isolierte RNA (2 µg), 10 µl 5 x Puffer (Thermo Scientific), 5 µl Random Pentadecamere (500 µM, Eurofins MWG Operon), 1 µl dNTPs (10 mM, Thermo Scientific), 0,25 µl RevertAid H Minus Reverse Transkriptase (200 U/µl, Thermo Scientific), 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl, Thermo Scientific) und DEPC-behandeltes Wasser eingesetzt. Die Ansätze wurden 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend folgte ein Inkubationsschritt für 50 min bei 37 °C. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Ansätze für 15 min auf 70 °C erhitzt. Die cDNAs wurden entweder direkt für die qPCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

### 2.2.11 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) wurde im CFX96 Thermocycler unter Verwendung der CFX Manager Software (Bio-Rad Laboratories GmbH) in einer Zweischnitt-Amplifikation durchgeführt. Dabei erfolgte zunächst eine UDG-Vorbehandlung bei 50 °C für 2 min, gefolgt von einem einmaligen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 min. Anschließend wurden 40 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 15 sec und Annealing/Elongation bei 60 °C für 1 min gefahren. Pro Ansatz wurden 8 µl cDNA, 10 µl 2 x Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Mastermix (Fermentas) und 2 µl Primerpaare (entweder kommerziell erwerbliche 10 x QuantiTect Primer Assays oder eigens synthetisierte und als 10 x Primermixe aus jeweils 3 µM Forward- und Reverse-Primer angesetzte Assays, siehe Tab 2.4) in einer 96-Well low-profile Mikrotiterplatte (Bio-Rad Laboratories GmbH) eingesetzt. Jede PCR-Reaktion wurde dabei in Doppelbestimmungen durchgeführt, deren  $C_t$ -Werte in der Auswertung zunächst arithmetisch gemittelt wurden. Zur Quantifizierung der Transkriptmengen wurden entsprechend der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode nach [Livak und Schmittgen, 2001] die  $C_t$ -Werte für jedes Gen zunächst auf ein Haushaltsgen in der gleichen Probe normalisiert und anschließend auf einen spezifisch gewählten Kalibrator relativiert.

Tab. 2.4: Primer für die quantitative Real-Time PCR

Genname	Gen-ID	Primer Cat.no.	Amplikon
QuantiTect Primer Assays			
<i>hActin</i>	60	QT00095431	Exon 3/4, bp 146
<i>hPp1ca</i>	5499	QT00031654	Exon 3/4, bp 121
<i>hPp1cb</i>	5500	QT00084210	Exon 7/8, bp 94
<i>hPp1cc</i>	5501	QT00013895	Exon 4/5, bp 111
<i>hPp2ca</i>	5515	QT00085603	Exon 6/7, bp 116
<i>hPp2cb</i>	5516	QT00085715	Exon 7/8, bp 83
<i>hPp3ca</i>	4676	QT00054418	Exon 2/3, bp 104
<i>hPp3cb</i>	3165	QT02317651	Exon 1/2, bp 125
<i>hPp3cc</i>	5533	QT00027041	Exon 1/2, bp 124
<i>hPp4c</i>	5531	QT00088977	Exon 5/6, bp 103
<i>hPp6c</i>	5537	QT00083433	Exon 4/5, bp 95
<i>hPp7ca</i>	5475	QT00044569	Exon 4/5, bp 131
<i>hPp7cb</i>	5470	QT00048657	3'UTR, bp 99
<i>hPer1</i>	5187	QT00069265	Exon 17/18, bp 118
<i>hPer2</i>	8864	QT00011207	Exon 6/7/8, bp 95
<i>hCry1</i>	1407	QT00025067	Exon 10/11, bp 109
<i>hCry2</i>	1408	QT00094920	Exon 1/2, bp 72
<i>hClock</i>	9575	QT00054481	Exon 21/22, bp 71
<i>hBmal1</i>	406	QT00011844	Exon 9/10, bp 91
<i>hRev-erb<math>\alpha</math></i>	9572	QT00000413	Exon 5/6, bp 113
<i>hDbp</i>	1628	QT00055755	Exon 3/4, bp 147
<i>hHdac3</i>	8841	QT00093730	Exon 2/3, bp 100
<i>hPp2r2b</i>	5521	QT00041699	Exon 2/3, bp 106
<i>hPp2r1a</i>	5518	QT00067732	Exon 1/2, bp 86
<i>hPp2r2b</i>	5519	QT00099953	Exon 5/6, bp 107
<i>mPp4c</i>	56420	QT00120470	Exon 7/8, bp 114
Genname	Gen-ID	Oligonukleotid-Sequenz	
synthetisierte Primer von Eurofins MWG Operon			
<i>hGapdh</i>	2597	Fwd TGCACCACCAACTGCTTAGC Rev ACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG	
<i>mGapdh</i>	407972	Fwd AAAGCTCACTGGCATGGCCTTGGGC Rev CATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTG	
<i>hPp4c 3' UTR</i>	5531	Fwd CAAGAGGGTGCTTCGAGGGT Rev GGTTC AAGTGGGGAGAGAGG	

## 2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.3.1 PUFFER

HEPES 1 mM	50 mM HEPES 140 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in <i>aqua dest.</i> pH 7,0
10 x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in <i>aqua dest.</i> pH 7,2
1 x PBS	100 ml 10 x PBS ad 1 l <i>aqua dest.</i>

### 2.3.2 ZELLKULTURMEDIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Medienformulierungen sind in Tab 2.5 zusammengefasst.

### 2.3.3 ZELLINIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Standard-Zelllinien und daraus generierte Reporter-Zelllinien sind in Tab 2.6 zusammengefasst.

### 2.3.4 ZELLKULTUR

Alle Zellen wurden im entsprechenden Zellkulturmedium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Die Passagierung erfolgte sobald ein Konfluenzgrad von etwa 75 % erreicht war. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit warmen 1 x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,1 %iger Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom-AG) versetzt und für etwa 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in frischem Medium

Tab. 2.5: Zellkulturmedien

Medium	Komponenten	Menge
Vollmedium mit Antibiotika	DMEM mit Phenolrot (PAA Laboratories)	500 ml
	FBS (Gibco)	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)	5 ml
	1 M HEPES	14 ml
Vollmedium ohne Antibiotika	DMEM mit Phenolrot (PAA Laboratories)	500 ml
	FBS (Gibco)	50 ml
	1 M HEPES	14 ml
Medium zur Selektion nach Transduktion	Vollmedium mit Antibiotika Puromycin oder Blastizidin 10 mg/ml	variabel 1/1000
Medium zur Synchronisation	Vollmedium ohne Antibiotika Dexamethason 1 mM (Sigma-Aldrich®)	variabel 1/1000
Luciferinhaltiges Medium zur Messung der Oszillationsdynamik	DMEM Phenolrot-frei (PAA Laboratories)	500 ml
	FBS (Gibco)	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)	5 ml
	1 M HEPES	14 ml
	0,1 mM D-Luciferin (P.J.K)	1:100
Medium zur Kryokonservierung	FBS (Gibco)	45 ml
	DMSO	5 ml

aufgenommen und zur Weiterkultivierung der Erhaltungskultur direkt 1:5–1:8 gesplittet, je nach Bedarf für weitere Experimente die gewünschte Zellzahl in das entsprechende Format ausgesät oder zur Kryokonservierung bei  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Zellzahl wurde mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung des Farbstoffs Trypanblau bestimmt. Dafür wurde ca. 10  $\mu\text{l}$  der trypsinierten Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit einer Trypanblaulösung vermischt und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellzahl wurde in 4 Quadranten gezählt und gemittelt. Die Zellkonzentration der Suspension (Zellzahl/ml) errechnete sich aus  $\text{Zellzahl/Quadrant} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$ .

Für die Kryokonservierung von Zellen wurden trypsinierte Zellen bei 300 g für 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet durch leichtes Schütteln in der Restflüssigkeit resuspendiert. Danach wurden die Zellen in 5 ml Einfriermedium, bestehend aus FBS und 10 % DMSO, aufgenommen und jeweils 1 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden in einem  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten Isopropanolbad für mehrere Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt und anschließend für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen direkt aus dem Stickstofftank entnommen und kurz im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 5–10 ml warmen Vollmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche (entweder T25 oder T75-Format) überführt. Standardmäßig wurde

**Tab. 2.6:** Standard-Zelllinien und daraus generierte Reporter-Zelllinien

Standard-Zelllinien	generelle Informationen	Verwendung
HEK 293	<i>homo sapiens</i> , embryonale Nierenzellen, ATCC®/CRL-1573™	Protein-Interaktion, Transaktivierung
HEK 293T	<i>homo sapiens</i> , embryonale Nierenzellen, SV40 large T-Antigen Expression	Virusproduktion
U-2 OS	<i>homo sapiens</i> , Osteosarkoma Knochenzellen, ATCC® HTB-96™	Generierung Reporterzelllinien (s.u.), ChIP
U-87 MG	<i>homo sapiens</i> , Glioblastoma Astrozyten, ATCC® HTB-14™	Generierung Reporterzelllinie (s.u.)
PER2::LUC Fibroblasten	<i>mus musculus</i> , Ohr-Fibroblasten, Isolation aus PER2::LUC Mäusen	Oszillationsdynamik
Reporter-Zelllinien	Expression	Verwendung
U-2 OS/ <i>Bmal1-Luc</i> <sup>(1)</sup>	Expression Firefly-Luciferase von einem 0,9 kb langem <i>Bmal1</i> -Promotorfragment	Oszillationsdynamik, mRNA-Zeitreihe
U-2 OS/ <i>Per2-Luc</i> <sup>(1)</sup>	<i>Per2</i> -Promotor getriebene Expression von Firefly-Luciferase	Oszillationsdynamik
U-2 OS/PER1::LUC <sup>(2)</sup>	CMV-Promotor getriebene Expression des Fusionsproteins PER1::Firefly-Luciferase	Proteinstabilität
U-2 OS/PER2::LUC <sup>(2)</sup>	CMV-Promotor getriebene Expression des Fusionsproteins PER2::Firefly-Luciferase	Proteinstabilität
U-2 OS/CLOCK::LUC <sup>(2)</sup>	CMV-Promotor getriebene Expression des Fusionsproteins CLOCK::Firefly-Luciferase	Proteinstabilität
U-2 OS/BMAL1::LUC <sup>(2)</sup>	CMV-Promotor getriebene Expression des Fusionsproteins BMAL1::Firefly-Luciferase	Proteinstabilität
U-87/ <i>Per2-Luc</i> <sup>(3)</sup>	<i>Per2</i> -Promotor getriebene Expression von Firefly-Luciferase	Oszillationsdynamik
PER2::LUC Fibroblasten	vom endogenen <i>Per2</i> -Promotor getriebene Expression des Fusionsproteins PER2::Firefly-Luciferase	Oszillationsdynamik

Generierung der Zelllinie durch:

<sup>(1)</sup> Dr. Bert Maier, Inst. für Med. Immunologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin

<sup>(2)</sup> Katja Schellenberg, Inst. für Med. Immunologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin

<sup>(3)</sup> Prof. Erich Herzog, Department of Biology, Washington University, St. Louis

mit den Zellen nach jedem Auftauvorgang ein Mycoplasmentest unter Verwendung des MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kits (Lonza) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.3.5 TRANSIENTE TRANSFEKTION

Für Co-Immunpräzipitationen von Uhrproteinen mit Phosphatase-Untereinheiten erfolgte die transiente Transfektion von HEK 293 Zellen mit Plasmid-DNA (siehe Tab. 2.3) unter Verwendung des Transfektions-Reagenz Arrest-In™ (Thermo Scientific Open Biosystems). Dazu wurden einen Tag vor der Transfektion  $4,5 \times 10^6$  HEK 293 Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Für die Transfektion wurden pro Ansatz in einem 1,5 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß insgesamt 12 µg Plasmid-DNA (je 6 µg Flag- und Myc-Konstrukt) in 1 ml Opti-MEM® (PAA Laboratories) pipettiert. Parallel wurden pro Ansatz in einem 15 ml Falcon 60 µl Arrest-In™ Reagenz in 1 ml Opti-MEM® angesetzt. Der Plasmid/Opti-MEM®-Mix wurde anschließend dem Arrest-In™ /Opti-MEM®-Mix zugegeben, kurz gevortext und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf ein Volumen von insgesamt 6 ml mit Opti-MEM® aufgefüllt und vorsichtig auf die HEK 293 Zellen gegeben. Ein Mediumswechsel mit 10 ml frischem, vorgewärmten Vollmedium erfolgte nach 4 h. Am 2. Tag post Transfektion (ca. 48 h) wurden die Zellen für die Proteinextraktion geerntet (siehe 2.4.2).

Für die Messung der PER2 Stabilität wurden HEK 293 Zellen mit Expressionsvektoren für *mPer2* und *Pp2r2b* bzw. *LacZ* unter Verwendung des Transfektions-Reagenz Arrest-In™ (Thermo Scientific Open Biosystems) transfiziert. Dazu wurden einen Tag vor der Transfektion  $3 \times 10^5$  HEK 293 Zellen in 12-Well Platten ausgesät. Für die Transfektion wurden pro Ansatz in einem 1,5 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß insgesamt 1 µg Plasmid-DNA (0,25 µg pDest51/*mPer2-V5* und entweder 0,75 µg pMyc-CMV-D12/*Pp2r2b* oder 0,75 µg pMyc-CMV-D12/*LacZ*) in 80 µl Opti-MEM® (PAA Laboratories) pipettiert. Parallel wurden pro Ansatz in einem 1,5 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß 5 µl Arrest-In™ Reagenz in 80 µl Opti-MEM® angesetzt. Der Plasmid/Opti-MEM®-Mix wurde anschließend dem Arrest-In™ /Opti-MEM®-Mix zugegeben, kurz gevortext und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf ein Volumen von insgesamt 500 µl mit Opti-MEM® aufgefüllt und vorsichtig auf die HEK 293 Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel mit 1 ml frischem,



vorgewärmten Vollmedium erfolgte nach 4 h. 24 h post Transfektion wurden die Zellen mit Cycloheximid behandelt (siehe 2.4.8).

Zur Messung der E-Box- sowie RRE-Transaktivierung erfolgte die Transfektion von HEK 293 mit Plasmid-DNA mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamin<sup>®</sup> 2000 (Life Technologies<sup>™</sup>). Dazu wurden einen Tag vor der Transfektion in einer 24-Well Platte jeweils  $1,75 \times 10^5$  HEK 293 Zellen in 500  $\mu$ l Vollmedium pro Well ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Dabei wurden pro Ansatz 50 ng Luciferase-Reportervektor (pGL3/E6S (*E-Box-Luc*) oder pAB-puro-SV40-RRE (*RRE-Luc*)) und 2 ng *Renilla-Luciferase*-Reportervektor (pHRL-SV40) zur Minimierung der Variabilität der Lumineszenzmessung durch Unterschiede in der Zellzahl und der Transfektionseffizienz pipettiert. Zusätzlich wurden spezifische Expressionsvektoren in variierenden Mengen eingesetzt (siehe Tab. 2.3, Abb. 3.10 und 3.15). Alle Transfektionsansätze wurden mit pDEST<sup>™</sup> 26/LacZ auf 1200 ng DNA in 150  $\mu$ l Opti-MEM<sup>®</sup> pro Well eingestellt. Parallel wurden pro Ansatz 3  $\mu$ l Lipofectamin<sup>®</sup> 2000 Reagenz in 150  $\mu$ l Opti-MEM<sup>®</sup> angesetzt. Anschließend wurde der Lipofectamin<sup>®</sup> 2000 /Opti-MEM<sup>®</sup>-Mix dem Plasmid/Opti-MEM<sup>®</sup>-Mix zugefügt, kurz gevortext und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte 300  $\mu$ l-Ansatz auf die kultivierten HEK 293 Zellen ohne Mediumwechsel pipettiert. Jeder Transfektionsansatz wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion für die Luciferase-Aktivitätsmessung geerntet (siehe 2.4.9).

### 2.3.6 VIRUSPRODUKTION VON LENTIVIREN IN HEK 293T

Die Virusproduktion für das RNAi-basierte Screening humaner Ser/Thr-Phosphatasen, der regulatorischen Untereinheiten von PP4c sowie den regulatorischen Untereinheiten von PP2A erfolgte im 96-Well Format. Alle in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Konstrukte zur genetischen mRNA-Depletion wurden von Thermo Scientific Open Biosystems bezogen (siehe Anhang Tab. 1, Tab. 3 und Tab. 4).

Am Vortag wurden  $3 \times 10^4$  HEK 293T Zellen/100  $\mu$ l in eine 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät. Am Folgetag erfolgte die Transfektion der individuellen shRNA-Konstrukte, sowie die für die Virusproduktion notwendigen Verpackungsplasmide mit Hilfe von Lipofectamin<sup>®</sup>

2000. Dabei wurde zunächst in einem 15 ml Falcon 2,75 ml Opti-MEM<sup>®</sup>, 11 µg psPAX und 6,6 µg pMD2G gemischt und 25 µl pro Well in eine 96-Well PCR Mikrotiterplatte (Costar) pipettiert. Anschließend wurde 1 µl Plasmid-DNA (Konz. ca. 200–600 ng/µl) pro Well hinzugegeben, die Platte mit einer Folie abgedeckt und bei 400 x g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde in einem zweiten 15 ml Falcon 2,75 ml Opti-MEM<sup>®</sup> mit 55 µl Lipofectamin<sup>®</sup> 2000 gemischt und nach einer 5-minütigen Inkubationszeit 25 µl pro Well pipettiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 400 x g für 1 min, erfolgte eine Inkubation von 20 min bei RT. Anschließend wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette der gesamte Transfektionsmix von 50 µl pro Well auf die am Vortag ausgesäte HEK 293T 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Am Folgetag wurde das gesamte Medium abgenommen und durch 150 µl Vollmedium ersetzt. Etwa 48 h nach Transfektion wurde das gesamte Medium von den Transfektionsplatten in 96-Well Multi Screen<sup>®</sup> HTS Filterplatten (Millipore) überführt und durch Zentrifugation bei 3200 x g für 1 min in V-Bottom-Platten transferiert. Anschließend erfolgte die Transduktion von U-2 OS/*Bmal1-Luc* Zellen mit den filtrierten Überständen (siehe 2.3.7).

Für die Messung der Oszillationsdynamik in 35 mm Zellkulturschalen, sowie für die mRNA-Zeitreihe, ChIP-Experimente und die Messung der Proteinstabilität wurden die entsprechenden Lentiviren in einem großen Maßstab hergestellt (T75 bzw. T175 Zellkulturflaschen). Dabei wurden HEK 293T Zellen am Vortag in T75 oder T175 Zellkulturflaschen ausgesät, so dass sie am Folgetag (Tag der Transfektion) ca. 50–70 % konfluent waren. Die Transfektion der pLenti6- oder pGIPz-basierten Expressionsplasmide, sowie die für die Virusproduktion notwendigen Verpackungsplasmide wurden mit Hilfe des CalPhos Mammalian Transfection Kit (BD-Biosciences) nach Herstellerangaben durchgeführt (siehe Tab. 2.7). Dabei wurde zunächst in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß oder 15 ml Falcon das Expressionsplasmid, psPAX, pMD2G und 2 M Calcium-Lösung gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf ein finales Volumen von 600 µl (T75) oder 1250 µl (T175) eingestellt. Anschließend wurde diese DNA-Lösung tropfenweise und unter leichtem Vortexen in das gleiche Volumen 2 x HBS-Puffer pipettiert und der Reaktionsansatz 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Transfektionsmix in 10,8 ml (T75) oder 22,5 ml (T175) Vollmedium pipettiert und auf die HEK 293T Zellen gegeben. Am Folgetag wurde das Medium gegen 12,5 ml (T75) oder 25 ml (T175) Vollmedium ersetzt. Etwa 48 h nach Transfektion erfolgte die 1. Virusernte,

indem das Medium abgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt wurde, welches über Nacht auf Eis bei 4 °C gelagert wurde. Anschließend wurden die HEK 293T erneut in 12,5 ml (T75) oder 25 ml (T175) Vollmedium weitere 24 h kultiviert, welches etwa 70 h nach Transfektion gesammelt und mit dem Medium der 1. Virusernte vereint wurde. Anschließend wurde der gesamte Virusüberstand für 15 min bei 4000 x g und 4 °C zentrifugiert und mit Hilfe einer 50 ml-Spritze durch einen 0,45 µm-Porenfilter (SARSTEDT) passiert. Der filtrierte Virusüberstand wurde direkt für die Transduktion (siehe 2.3.7) eingesetzt oder in 4 ml-Aliquots bei –80 °C eingefroren.

**Tab. 2.7:** Lentivirusproduktion im großen Maßstab

	<b>T75</b>	<b>T175</b>
Expressionsplasmid	8,4 µg	17,5 µg
psPAX	6 µg	12,5 µg
pMD2G	3,6 µg	7,5 µg
2M Ca	74,4 µl	155 µl
H <sub>2</sub> O	ad 600 µl	ad 1250 µl
2x HBS	600 µl	1250 µl
Gesamtvolumen	1200 µl	2500 µl

### 2.3.7 LENTIVIRALE TRANSDUKTION

Die lentivirale Transduktion erfolgte in unterschiedlichen Zelltypen und Zellformaten (siehe Tab. 2.8). Generell wurden die zu transduzierenden Zellen zunächst trypsinisiert und in Vollmedium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem entsprechenden filtrierte Virusüberstand und 8 ng/µl Protaminsulfat direkt in der Zellkulturschale oder in einer weißen 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc) gemischt. Nach ca. 24 h Kultivierung erfolgte ein Mediumwechsel auf Selektionsmedium (je nach Antibiotikaresistenz entweder Puromycin 10 mg/ml (Sigma-Aldrich®) oder Blastidin 10 mg/ml (Life Technologies™). Selektionierte Zellen wurden dann entweder nochmals unter Selektionsdruck in das gewünschte Zellkulturformat expandiert oder direkt für ein Experiment verwendet.

**Tab. 2.8:** lentivirale Transduktion in verschiedenen Experimenten

	Oszillations- dynamik	Phosphatase Screening	ChIP	Protein- Stabilität	mRNA Zeitreihe
Zelltyp	U-2 OS/ <i>Bmal1-Luc</i> oder <i>Per2-Luc</i>	U-2 OS/ <i>Bmal1-Luc</i>	U-2 OS	U-2 OS/ ORF::LUC	U-2 OS/ <i>Bmal1-Luc</i>
Zellformat	35 mm	96-Well	T175	35 mm	T175
Zellzahl	$2 \times 10^5$ /1 ml	$2 \times 10^4$ /50 $\mu$ l	$2 \times 10^6$ /10 ml	$2 \times 10^5$ /1 ml	$2 \times 10^6$ /10 ml
Virusmenge	1 ml	150 $\mu$ l	10 ml	1 ml	10 ml
Selektion	Tag 2	Tag 2	Tag 2	Tag 2	Tag 2
Expansion			Tag 6 1:6 in 6 x 15 cm	Tag 9 $4 \times 10^4$ /1 ml in 24-Well	Tag 4 $1,75 \times 10^5$ /1 ml in 12-Well
Synchronisation	Tag 4	Tag 5	Tag 11		Tag 5
Start Experiment	Tag 4	Tag 5	Tag 12	Tag 14	Tag 6

### 2.3.8 MESSUNG DER OSZILLATIONS-DYNAMIK IN LEBENDEN ZELLEN

Die Messung der Oszillationsdynamik in lebenden Zellen erfolgte über 5–7 Tage für die Phosphatase-Screenings entweder in weißen 96-Well Mikrotiterplatten (Nunc) im TopCount Luminometer (PerkinElmer) oder für alle anderen Experimente in 35 mm Zellkulturschalen im Lumicycle (Actimetrics), bzw. in speziell für das Labor angefertigten einzelnen Photonen-Detektoren (Hamamatsu Photonics). Dabei wurde über mehrere Tage die Aktivität des Reportergens Luziferase ausgelesen. Luciferase katalysiert in einem  $Mg^{2+}$ - und ATP-abhängigen Prozess die oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin, wobei Photonen emittiert werden.

Vor Beginn jeder Messung wurden die Zellpopulationen mit dem Glucocorticoid Dexamethason (Sigma-Aldrich®) für 30 min bei 37 °C in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen mit warmen 1 x PBS gewaschen und Phenolrot-freies Vollmedium, supplementiert mit 250  $\mu$ M D-Luciferin (P.J.K GmbH), zugegeben. Die Zellkulturschalen wurden mit Parafilm abgedichtet und in den Lumicycle oder Photonen-Detektoren bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> überführt.

Die Datenauswertung erfolgte am Ende der Messung mit Hilfe einer Labor-internen Software Chronostar2. Dabei wurden zunächst die Rohdaten durch Division des 24 h gleitenden Mittelwertes trendeliminiert und anschließend ein optimaler Sinusfit an die Werte angepasst [Maier et al., 2009]. Die Parameter Periode, Amplitude, Dämpfung, Magnitude und Phase konnten anschließend evaluiert werden.

### 2.3.9 MESSUNG DER CIRCADIENEN EXPRESSION VON UHRGENEN

Für die Messung der circadianen Expression von Uhrgenen bei genetischer mRNA-Depletion oder ektopischer Überexpression von *Pp4c* wurden humane U2-OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen in T175 Zellkulturflaschen lentiviral entweder mit einer shRNA gegen *Pp4cc* (pGIPz/*Pp4c* V3LHS\_634656) oder pLenti6/*Pp4c* transduziert. Als Kontrollen dienten entweder eine nicht-gerichtete Kontroll-shRNA (*non-silencing* RHS4346) oder pLenti6/*tGfp* (siehe 2.3.7 und Tab. 2.8). Vier Tage nach der Transduktion wurden  $1,75 \times 10^5$  selektionierte Zellen/1 ml in 12-Well Platten ausgesät und die RNA 24 h nach Synchronisation mit 1  $\mu$ M Dexamethason in 4 h-Intervallen über einen Zeitraum von 48 h extrahiert. Mittels RT-qPCR wurden die Genexpressionslevel relevanter Uhrgene und *Pp4c* zu unterschiedlichen Zeiten analysiert. Die Quantifizierung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durch Normalisierung auf *Gapdh* oder *Actin* und für jedes untersuchte Gen relativ zur mittleren Expression der jeweiligen Kontrollzellen (siehe 2.2.11).

Zur Messung der circadianen Uhrgenexpression bei genetischer mRNA-Depletion von *Pp2A*, wurden ebenfalls humane U2-OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen lentiviral mit jeweils einer shRNA gegen die katalytischen Untereinheiten *Pp2ca* (pGIPz/*Pp2ca* V2LHS\_170340) und *Pp2cb* (pGIPz/*Pp2cb* V2LHS\_173251) transduziert. Als Kontrolle fungierte eine nicht-gerichtete Kontroll-shRNA (*non-silencing* RHS4346). Die Zellaussaat, Synchronisation, Zellernte und Messung der Transkriptmengen relevanter Uhrgene erfolgte wie oben beschrieben.

## 2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

### 2.4.1 PUFFER

RIPA-Puffer	1 x PBS 1 % Igepal CA-630 0,5 % Na-Deoxycholat 0,1 % SDS
Co-IP Lysispuffer	20 mM Tris-HCL, pH 8,0 140 mM NaCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM TCEP

	1 % Triton-X-100 10 % Glycerin
Co-IP Waschpuffer	20 mM Tris-HCL, pH 8,0 150 mM NaCl 0,5 % Igepal CA-630
BCA, Reagenz A	2 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x H <sub>2</sub> O 1 % BCA-Na <sub>2</sub> 0,95 % NaHCO <sub>3</sub> 0,4 % NaOH 0,16 % Na <sub>2</sub> -Tartrat ad 1 l <i>aqua dest.</i> , pH 11,25
BCA, Reagenz B	4 % CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
10 x TBS	1,37 M NaCl 100 mM Tris-Base pH 7,3
1 x TBST	100 ml 10 x TBS 0,05 % Tween 20 ad 1 l <i>aqua dest.</i>
Blockierungslösung	1 x TBST 5 % Magermilchpulver
ChIP Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,4 10 mM DTT
Puffer I	0,25 % Triton-X-100 10 mM EDTA 0,5 mM EGTA 10 mM HEPES pH 6,5
Puffer II	200 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 10 mM HEPES pH 6,5
ChIP-Lysis-Puffer	1 % SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl, pH 8,1
Dilution-Puffer	1,1 % Triton-X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl, pH 8,1 150 mM NaCl
Cross-link reversal Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,5

	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	1 % SDS
TSE I	0,1 % SDS
	1 % Triton-X-100
	2 mM EDTA
	20 mM Tris-HCl, pH 8,1
	150 mM NaCl
TSE II	0,1 % SDS
	1 % Triton-X-100
	2 mM EDTA
	20 mM Tris-HCl, pH 8,1
	500 mM NaCl
TSE III	0,25 mM LiCl
	1 % NP-40
	1 % Deoxycholat
	1 mM EDTA
	10 mM Tris-HCl, pH 8,1
TSE IV	10 mM Tris-HCl, pH 8,1
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA

#### 2.4.2 PROTEINEXTRAKTION

Die Proteinextraktion aus Zellen erfolgte abhängig vom Experiment in verschiedenen Maßstäben und unter Verwendung unterschiedlicher Pufferformulierungen und -volumina. Zunächst wurde das Zellkulturmedium vollständig abgesaugt und die Zellen mit warmen 1 x PBS gewaschen. Danach wurde eine entsprechende Menge Lysispuffer zugegeben.

Bei der Herstellung von Proteinlysaten für die Co-Immunpräzipitation wurde 48 h nach der transienten Transfektion HEK 293 Zellen aus 10 cm Zellkulturschalen (siehe 2.3.5) durch Zugabe von 700 µl Co-IP Puffer supplementiert mit  $1/100$  Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich®) geerntet. Dabei wurden die Zellen auf Eis mit einem Zellscraper abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

Zur Gewinnung von Proteinen zur allgemeinen Analyse von Proteinabundanz wurden Zellen entweder aus 24-Well oder 12-Well Platten in 80–150 µl RIPA-Puffer supplemen-

tiert mit  $1/100$  Protease-Inhibitor-Cocktail lysiert. Die Zellkulturplatten wurden zunächst ca. 10 min bei 4 °C auf einem Schwenkschüttler inkubiert und anschließend wurden die Lysate in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt.

Alle Lysate wurden anschließend unter gelegentlichem Vortexen 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Abtrennung der Zellbruchstücke durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C. Die geklärten Lysate wurden in neue 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und die Konzentration mittels BCA-Test bestimmt (siehe 2.4.3). Die Proteinlysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.4.3 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Um gleiche Proteinmengen für die SDS-PAGE (siehe 2.4.4) einsetzen zu können, wurde der Proteingehalt in jedem Zelllysate (siehe 2.4.2) mittels BCA-Test bestimmt. Der Nachweis beruht darauf, daß Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$  in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion) und dabei zu  $\text{Cu}^+$  reduziert werden. Die  $\text{Cu}^+$ -Ionen bilden dann mit Bicinchinonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Als Proteinstandard diente bovines Serumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0,125–10 mg/ml, welches entsprechend den Proteinlysaten entweder in Co-IP - Puffer oder RIPA - Puffer verdünnt wurde. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde in 3-fach Bestimmungen 5 µl des Lysates bzw. des BSA-Standards und 5 µl Lyse-Puffer als Blindwert mit jeweils 200 µl BCA-Reagenz (Reagenz A/B 50:1) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert, mit einer Folie verschlossen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Ansätze bei 560 nm im Plattenreader Infinite® 200 PRO (Tecan) gemessen und die Protein-Konzentration anhand der BSA-Standardgeraden berechnet.

### 2.4.4 SDS-PAGE

Die Auftrennung der im Zelllysate enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese) erfolgte je nach Probenvolumen in 1 mm oder 1,5 mm dicken 4–12 % igen NuPAGE Gradienten-Gelen (NuPAGE 4–12% Bis Tris Gel, Life Technologies™), unter Verwendung der System-internen Elektrophoresekammer



und Pufferformulierungen. Der 20 x NuPAGE MES SDS Laufpuffer (Life Technologies™) wurde mit *aqua dest.*  $1/20$  verdünnt und vollständig in die Apparatur gefüllt. Anschließend wurden die Taschen nach Abziehen des Gelkammes vor der Probenbeladung gut gespült. Pro Geltasche wurde zunächst 50–100 µg Proteinlysate mit H<sub>2</sub>O auf ein Probenvolumen von 15–35 µl eingestellt und anschließend im Verhältnis  $1/4$  mit 4 x NuPAGE LDS Probenpuffer (Life Technologies™) – supplementiert mit 0,8 %  $\beta$ -Mercaptoethanol– für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert und mit Hilfe von 100 µl-Kapillarspitzen beladen. Als Größenmarker wurde 5 µl MagicMark XP (Life Technologies™) eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers in 1 x NuPAGE MES SDS Laufpuffer (Life Technologies™) bei 200 V für ca. 60–90 min je nach gewünschter Auftrennungslänge der zu analysierenden Proteine.

#### 2.4.5 WESTERNBLOT

Die mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden für 2–3 h bei konstanter Stromstärke von 400 mA in einem mit Eis gekühlten Nassblot-Tanksystem (Mini Protean 3 Zelle, Bio-Rad Laboratories GmbH) auf Nitrozellulose-Membranen (Schleicher and Schuell) transferiert. Dabei wurde ein Sandwich aus Filterpapieren (Whatman Gel Blotting Paper, Schleicher and Schuell), Gel und Membran entsprechend der Herstellerangaben von Bio-Rad Laboratories GmbH aufgebaut. Als Transferpuffer wurde der 20 x NuPAGE Transfer Puffer (Life Technologies™) mit *aqua dest.*  $1/20$  verdünnt und mit 20 % Methanol versetzt. Die Membranen wurden nach dem Transfer bei RT für mind. 1 h in 20 ml 5 % iger Trockenmilch in 1 x TBST-Puffer blockiert. Anschließend wurden die Membranen in 4 ml 1 x TBST-Puffer mit der entsprechenden Konzentration an primären Antikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert (siehe Tab. 2.9). Nach dreimaligem Waschen mit 5 ml 1 x TBST-Puffer für jeweils 10 min erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörper für 1,5 h (siehe Tab. 2.9). Anschließend wurde die Membran nochmals mit 5 ml 1 x TBST-Puffer für jeweils 10 min gewaschen. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter langsamen Schwenken auf einem Wippeschüttler (Rocky N, Fröbel Labortechnik). Die Detektion erfolgte durch Zugabe von 2 ml Chemilumineszenzlösung (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce)

mit der Kameraeinheit ChemoCam (Intas). Die Bilder wurden digital gespeichert und die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Bildverarbeitungs-Software ImageJ 1.44p (National Institute of Health) durch Auslesen der Pixelintensität.

**Tab. 2.9:** Antikörper für Westernblot, Immunpräzipitation und ChIP-Experimente

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Verwendung	Hersteller
<b>primäre Antikörper</b>				
$\alpha$ -V5	mouse	1:5000	WB	Life Technologies™, R960-25
$\alpha$ -Myc	rabbit	1:250–1:1000	IP, WB	Novus Biologicals, NB 600-335
$\alpha$ -Flag	mouse	1:1000	IP, WB	Sigma-Aldrich®, F3165
$\alpha$ - $\beta$ -Actin	mouse	1:100000	WB	Sigma-Aldrich®, A5441
$\alpha$ -BMAL1	rabbit	1:250	ChIP	Michael Brunner <sup>(1)</sup>
$\alpha$ -HDAC3	rabbit	1:250	ChIP	Santa Cruz, sc-11417
$\alpha$ -AcH3	rabbit	1:1000	ChIP	Millipore, 06-599
<b>sekundäre Antikörper</b>				
$\alpha$ -mouse IgG-HRP	goat	1:1000	WB	Santa Cruz, sc-2005
$\alpha$ -rabbit IgG-HRP	donkey	1:1000	WB	Santa Cruz, sc-2317

WB = Westernblot, IP = Immunpräzipitation, ChIP = Chromatin-Immunpräzipitationen

<sup>(1)</sup> Biochemie Zentrum Universität Heidelberg (BZH)

## 2.4.6 IMMUNPRÄZIPITATION

Zur Detektion von Proteinkomplexen von Uhrproteinen und PP4c bzw. Untereinheiten von PP2A wurden HEK 293 Zellen transient mit den entsprechenden Epitop-getaggten Expressionskonstrukten transfiziert (siehe 2.3.5) und daraus Proteinextrakte hergestellt (siehe 2.4.2). Für die Co-IP-Ansätze wurden je 500  $\mu$ g Gesamtprotein auf ein Volumen von 500  $\mu$ l mit Co-IP Lysis-Puffer in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingestellt. Für den anschließenden (optionalen) Preclearing-Schritt wurden die Lysate mit jeweils 30  $\mu$ l Protein G Plus-Agarose Beads (Santa Cruz) versetzt und 2 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Danach wurden die Ansätze bei 10000 rpm für 2 min bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Alle geklärten Lysate (außer die Kontrollen ohne Antikörper) wurden mit 2  $\mu$ l  $\alpha$ -Myc Antikörper (Novus Biologicals) versetzt und 2 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden alle Lysate mit 30  $\mu$ l Protein G Plus-Agarose Beads versetzt und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 2 min bei 4 °C und 2800 rpm. Die

weitere Aufarbeitung der Immunpräzipitationsproben erfolgte durch 2-maliges Waschen mit Co-IP Waschpuffer (supplementiert mit  $1/100$  Protease-Inhibitor-Cocktail). Zwischen den Waschschritten wurden die Proben gut aufgeschüttelt und kurze Zeit auf Eis inkubiert, anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 2 min bei 4 °C und 2800 rpm. Im letzten Waschschrift wurden die Protein G Plus-Agarose Beads bei 10000 rpm für 2 min abzentrifugiert und der Überstand mit einer Kapillarspitze vollständig abgenommen ohne dabei das Bead-Pellet zu zerstören. Anschließend wurde das Bead-Pellet mit 30 µl 1 x NuPAGE LDS-Probenpuffer (Life Technologies™) versetzt und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben bei 95 °C für 10 min aufgeköcht und anschließend bei 10000 rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Mittels SDS-PAGE und Westernblot erfolgte die weitere Analyse der Proben (siehe 2.4.4 und 2.4.5).

#### 2.4.7 CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION

Für Chromatin-Immunpräzipitationen wurden stabil transduzierte U-2 OS-Zellen verwendet (siehe 2.3.7). Für die Zellernte wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Die weitere Aufarbeitung der Proben wurden von Dr. Roman Klemz durchgeführt. Die Fixierung der DNA-Protein-Bindungen erfolgte mit 10 ml 1 % Formaldehyd (gelöst in 1 x PBS) für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, mit einem Zell-Scraper von der Zellkulturschale gelöst, in 5–10 ml ChIP-Puffer aufgenommen und 15 min bei 37 °C zur Kernextraktion inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 2000 g für 5 min und 4 °C zentrifugiert und sequentiell erst mit Puffer I, danach mit Puffer II gewaschen, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 2000 g für 5 min und 4 °C nach jedem Waschschrift. Die Zellen wurden anschließend in 0,5 ml ChIP-Lysis-Puffer resuspendiert und auf Eis einmalig mit 15 % Intensität, danach 5 Mal mit 25 % Intensität für jeweils 15 sec sonifiziert (Bandelin Sonoplus HD2070) um Chromatinfragmente von durchschnittlich 500 bp zu erhalten. Das fragmentierte Chromatin wurde anschließend bei 12000 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände 1:8 mit Dilution-Puffer verdünnt.

Die Input-Kontrollen wurden in Replikaten angesetzt. Dafür wurde jeweils 5 µl verdünntes Chromatin verwendet und in 35 µl cross-link reversal Puffer aufgenommen. Für jedes

Chromatin wurden zwei unabhängige Immunpräzipitationsreaktionen durchgeführt. Dabei wurden jeweils 500 µl verdünntes Chromatin mit spezifischen Antikörpern angesetzt und für 1 h auf dem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden entweder 1:250  $\alpha$ -BMAL1 (Michael Brunner), 1:250  $\alpha$ -HDAC3 (Santa Cruz) oder 1:1000  $\alpha$ -AcH3 (Millipore) verwendet (siehe Tab. 2.9). Anschließend wurden pro Ansatz 50 µl Protein-Agarose-A-Beads in TSE I-Puffer zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Die immunpräzipitierten Fragmente wurden sequentiell in TSE I-, TSE II-, TSE III- und TSE IV-Puffer gewaschen, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 12000 g für 1 min nach jedem Waschschritt. Die gewaschenen Beads wurden zuletzt in 50 µl cross-link reversal Puffer aufgenommen.

Die Input-Kontrollen und präzipitierten Fraktionen wurden bei 65 °C über Nacht inkubiert um die vernetzten Protein-DNA-Komplexe zu lösen. Von jedem Ansatz wurden 40 µl mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend in 30 µl Elutionspuffer eluiert und mit H<sub>2</sub>O 1:4 verdünnt. Alle Proben wurden mittels quantitative real-time PCR in Duplikaten unter Verwendung von spezifischen Primern (jeweils 1 µM) analysiert (siehe 2.2.11 und Tab. 2.10).

**Tab. 2.10:** qPCR-Primer für Chromatin-Immunpräzipitationen

ChIP	Promotorelement	forward Primer (5'–3')	reverse Primer (5'–3')
$\alpha$ -BMAL1	E-Box in <i>hRev-erba</i>	CCTTCTCTGGACTTTGCCCT	AAACCTTGCAAACGTGAGGG
$\alpha$ -HDAC3	RRE in <i>hBmal1</i>	GGTTGGGCACAGCGATTG	CTGCCTTCCCTAAATGTCGC
$\alpha$ -AcH3	RRE in <i>hBmal1</i>	GGTTGGGCACAGCGATTG	CTGCCTTCCCTAAATGTCGC
Kontrolle	<i>hGapdh</i>	GCGCCCCCGGTTTCT	CCTAGCCTCCCGGGTTTC

#### 2.4.8 CYCLOHEXIMID-EXPERIMENTE

Zur Messung der Halblebenszeit von Uhrproteinen bei genetischer mRNA-Depletion von *Pp4c* wurden von Katja Schellenberg generierte stabile U-2 OS Zelllinien verwendet (siehe Tab. 2.6), die jeweils ein Fusionsprotein aus Luciferase und PER1, PER2, CLOCK oder BMAL1 exprimieren. In 35 mm-Zellkulturschalen wurden die Zelllinien entweder mit einer nicht-gerichteten Kontroll-shRNA oder einer shRNA gegen *Pp4c* transduziert (siehe 2.3.7)

und nach 9 Tagen  $4 \times 10^4$  transduzierte Zellen in 1 ml in jeweils 2 x Wells einer 24-Well Platte ausgesät. Die Zellernte erfolgte 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 6 h nach Zugabe von 200  $\mu$ l Vollmedium, supplementiert mit Cycloheximid (Sigma-Aldrich®) in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml bzw. DMSO als Kontrolle, zum vorhandenen Medium. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, in 200  $\mu$ l 1 x Passiv-Lysis-Puffer (Promega) lysiert und die 24-Well Mikrotiterplatte bei  $-80^\circ\text{C}$  für 1 h eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellextrakte mit der Pipette vollständig homogenisiert und die Luciferase-Aktivität, repräsentativ für die Proteinabundanz, im OrionII (Berthold Detection Systems) gemessen. Dafür wurden zunächst 5  $\mu$ l Lysat in Doppelbestimmungen auf eine weiße 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc) transferiert. Anschließend erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität für 10 sec durch automatische Injektion von 25  $\mu$ l LARI (Promega) pro Well.

Für die Messung der PER2 Stabilität bei ektopischer Überexpression von *Pp2r2b* wurden transient transfizierte HEK 293 Zellen verwendet (siehe 2.3.5). 24 h nach der Transfektion wurde auf das vorhandene Zellmedium 500  $\mu$ l vorgewärmtes Vollmedium, supplementiert mit Cycloheximid (Sigma-Aldrich®) in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml bzw. DMSO in gleicher Verdünnung zugegeben. Nach 2 h, 4 h, 6 h, 9 h und 12 h erfolgte die Zellernte und Proteinextraktion in 100  $\mu$ l RIPA-Puffer (supplementiert mit  $1/100$  Protease-Inhibitor) pro Well (siehe 2.4.2). Anschließend wurden jeweils 80  $\mu$ g Gesamtprotein mittels SDS-PAGE und Westernblot (siehe 2.4.4 und 2.4.5) analysiert. Die PER2-V5 Abundanz, sowie zur Normalisierung die  $\beta$ -Actin Abundanz, wurde mittels  $\alpha$ -V5 Antikörper bzw.  $\alpha$ - $\beta$ -Actin nachgewiesen und die Pixelintensität jeder Bande mit der Software ImageJ quantifiziert.

#### 2.4.9 TRANSAKTIVIERUNG VON E-BOX UND RRE-ELEMENTEN

Zur Messung der E-Box- sowie RRE-Transaktivierung mittels Luciferase-Aktivität wurde das Dual-Reporter-Assay System von Promega nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die transfizierten HEK 293 Zellen (siehe 2.3.5) wurden 48 h nach der Transfektion geerntet. Dazu wurde das Zellmedium vollständig abgezogen und die Zellen mit warmen 1 x PBS gewaschen. Danach wurden pro 24-Well 200  $\mu$ l 1 x Passiv-Lysis-Puffer (Promega) zugegeben und anschließend die Zelllysate 1 h bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Für die Luciferase-Aktivitätsmessung wurden jeweils 5  $\mu$ l der mit einer Pipette und mittels Vortexer gründlich

homogenisierten Zellextrakte in eine weiße 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc) transferiert. Pro Ansatz wurden Duplikate gemessen. Die Detektion der Lumineszenz in jeder Probe erfolgte durch automatische Zugabe der jeweiligen Luciferase-Substrate in einem Platten-Luminometer (OrionII, Berthold Detection Systems). Dabei wurde zunächst durch die Injektionseinheit des Gerätes pro Well 25 µl LARII (Beetle-Luciferin) zugegeben und nach 2 sec für 10 sec die Biolumineszenz der Firefly-Luciferase gemessen. Danach erfolgte die Zugabe von 25 µl Stop&Glow Substrat (Coelenterazin) und erneut nach 2 sec für 10 sec die Messung der Renilla-Luciferase Aktivität. Die Auswertung erfolgte durch Normalisierung der gemessenen Firefly-Luciferase-Aktivität auf die Renilla-Luciferase-Aktivität.

### 3 ERGEBNISSE

Die reversible Phosphorylierung ist ein bedeutender regulatorischer Mechanismus für viele biologische Prozesse in eukaryontischen Organismen. Der Phosphorylierungsgrad eines Proteins wird durch die Aktivität von Proteinkinasen und -phosphatasen dynamisch kontrolliert. Phosphorylierungen durch Kinasen sind für fast alle Uhrproteine bekannt, und für die Generierung und Aufrechterhaltung eines normalen circadianen Rhythmus essentiell. Diese finden für Uhrproteine vorzugsweise an spezifischen Serin/Threonin(Ser/Thr)-Aminosäuren statt. Im Gegensatz dazu ist die funktionelle Relevanz von Phosphatasen bisher nur wenig charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein RNAi-basiertes Screening durchgeführt, um systematisch neue, noch unbekannte Ser/Thr-Phosphatasen, welche die circadiane Oszillationsdynamik beeinflussen, zu identifizieren (siehe Kapitel 3.1). Anschließend wurde in Folgeexperimenten eine potentielle regulative Funktion von ausgewählten Phosphatase-Kandidaten im molekularen Uhrmechanismus analysiert (siehe Kapitel 3.2 und 3.3)

#### 3.1 RNAI-BASIERTES CIRCADIANES SCREENING IN HUMANEN ZELLEN NACH SER/THR-PHOSPHATASEN

Um systematisch zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß die Aktivität von humanen Ser/Thr-Phosphatasen für die Generierung von molekularen circadianen Rhythmen eine Rolle spielt, wurde im Rahmen eines Screenings die RNAi-Technologie mit einer in der Chronobiologie weit verbreiteten Methode kombiniert, welche die Messung der circadianen Oszillationsdynamik in lebenden Zellen erlaubt. Grundanforderung für dieses Vorgehen waren dabei einerseits eine effiziente und stabile mRNA-Depletion der zu untersuchenden Gene, die mittels lentiviraler Transduktion von shRNA-Konstrukten durchgeführt wurde. Desweiteren war die Verwendung einer speziellen Zelllinie grundlegend, welche in Kultur

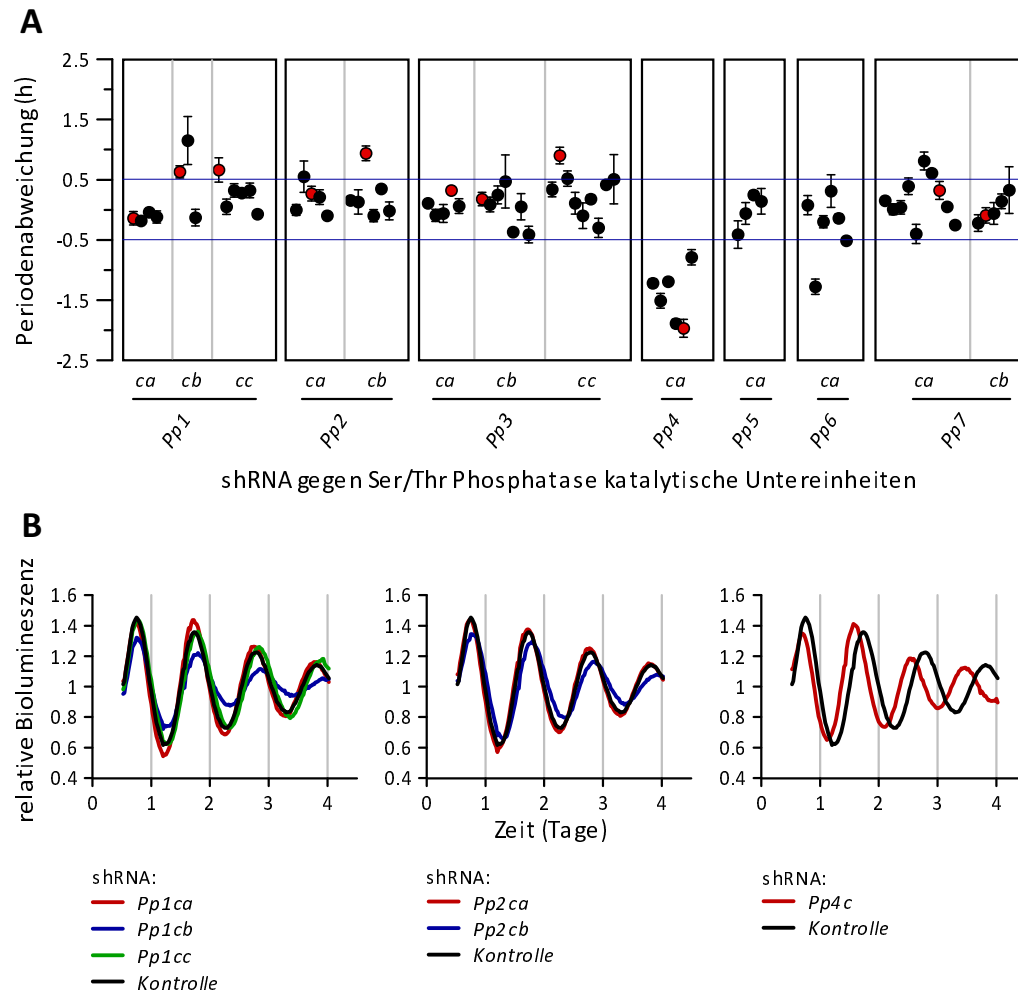
eine robuste circadiane Oszillation mit hoher Amplitude über mehrere Tage aufweist. Die humane Osteosarcoma Zelllinie U-2 OS erfüllt diese Kriterien und wurde daher genetisch so manipuliert, dass sie als Reportersystem ein Luciferase-Gen unter einem circadian getriebenen *Bmal1*-Promotor-Fragment exprimiert [Maier et al., 2009]. Die rhythmische Luciferase-Aktivität spiegelt somit die endogene circadiane Uhr der Zellen wider und kann über mehrere Tage in einem Luminometer gemessen werden. In diesen Reporterzellen wurden zur RNAi-vermittelten mRNA-Depletion spezifische shRNA-Konstrukte gegen aktuell annotierte Isoformen der katalytischen Untereinheiten von Ser/Thr-Phosphatasen lentiviral eingebracht. Diese integrieren stabil in transkriptionsaktive Bereiche des Genoms und führen zu einer lang anhaltenden mRNA-Depletion der entsprechenden Gene. Anhand einer computergestützten Analyse der für die Oszillationsdynamik entscheidenden Parameter wie Periode, Amplitude, Magnitude und Dämpfung, wurde untersucht, ob die spezifische Depletion einer katalytischen Untereinheit einer Phosphatase zu einem veränderten circadianen Phänotyp führt. Dabei wurde ein Gen als potentieller Kandidat definiert, wenn mindestens drei unterschiedliche shRNA-Konstrukte pro katalytische Untereinheit eine gleichgerichtete Periodenabweichung von der Kontroll-shRNA<sup>1</sup> um mindestens  $\pm 0,5$  h aufwiesen (siehe Abb. 3.1 und Anhang Tab. 1). Die Periodenanalyse des Screenings ergab, dass ausschließlich Protein Phosphatase 4 diese Kriterien erfüllt (siehe Abb. 3.1). Die Depletion der einzigen katalytischen Untereinheit von PP4 (*Pp4ca*) resultierte in einer signifikanten Periodenverkürzung von bis zu 2 Stunden, die in sechs unabhängigen shRNA-Konstrukten zu sehen war. Die katalytischen Untereinheiten der anderen Phosphatasen wiesen entweder gar keine circadianen Phänotypen auf, oder zeigten nur leichte Tendenzen einer geringfügig verlängerten Periode von einzelnen shRNA-Konstrukten, wie z. B. bei *Pp1cb*, *Pp1cc* und *Pp2cb*. Dass hier keine Veränderungen der Oszillationsdynamik festzustellen waren, könnte an drei Gründen liegen: Erstens war eine technische Limitation in diesem Screening im Mikrotiterplattenformat, dass es keine Möglichkeit zur Bestimmung der Effizienz der mRNA-Depletionen gab. Daher ist unklar, ob einzelne shRNA-Konstrukte funktional sind. Zweitens könnten die Phosphatasen für die circadiane Uhr keine Rolle spielen oder die katalytischen Untereinheiten in U-2 OS Zellen nicht exprimiert sein. Drittens könnte ein

---

<sup>1</sup>GIPz basierte lentivirale Kontroll-shRNA, die nicht gegen eine spezifische mRNA-Sequenz gerichtet ist und eine unspezifische Antwort in Zellen reflektiert.



potentieller circadianer Phänotyp maskiert sein, da mehrere Isoformen der katalytischen Untereinheiten von PP1, PP2, PP3 und PP7 existieren und diese Untereinheiten funktional redundant sein oder sich gegenseitig kompensieren könnten.

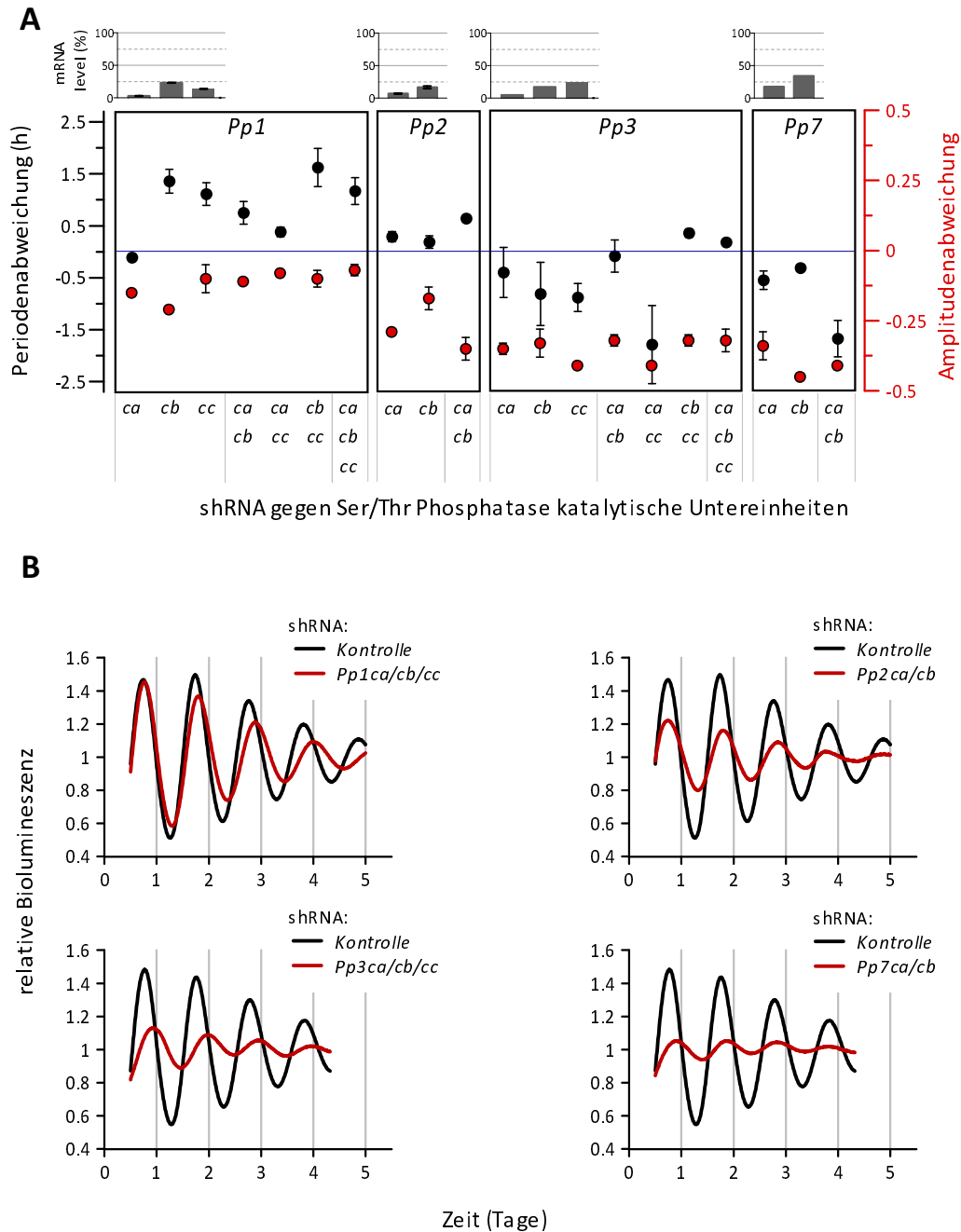


**Abb. 3.1: Gezielte RNAi-vermittelte mRNA-Depletion katalytischer Untereinheiten humaner Ser/Thr-Phosphatasen beeinflusst die circadiane Oszillationsdynamik.**

**(A)** RNAi-basiertes Screening nach veränderten Periodenphänotypen von einzelnen katalytischen Phosphatase Untereinheiten (Isoformen *ca*, *cb* oder *cc*) in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten im 96-Well Format  $\pm$  Standardabweichung. Jeder Punkt repräsentiert ein spezifisches shRNA-Konstrukt gegen die jeweilige katalytische Untereinheit und stellt die Periodenabweichung von der Kontroll-shRNA dar. Ein Gen wurde als Kandidat definiert, wenn mindestens drei individuelle shRNA-Konstrukte pro katalytische Untereinheit eine Periodenabweichung von mind.  $\pm 0,5$  h in die gleiche Richtung zeigten (horizontale blaue Linien). **(B)** Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen für die in A dargestellten Experimente (jeweils rot markierte Konstrukte) für *Pp1*, *Pp2* und *Pp4*.

Aus diesen Gründen wurde ein zweites Screening durchgeführt, bei dem die katalytischen Untereinheiten der entsprechenden Phosphatasen in allen möglichen Kombinationen gleichzeitig depletiert, und anschließend die Auswirkungen dieser Mehrfachdepletionen auf die circadiane Oszillationsdynamik untersucht wurde (siehe Abb. 3.2 und Anhang Tab. 2). Dazu wurden im Vorfeld zufällig shRNA-Konstrukte der jeweiligen katalytischen Untereinheiten ausgewählt und auf eine effiziente mRNA-Depletion getestet (rote Punkte, siehe Abb. 3.1A). Alle Konstrukte reduzierten die Expression der entsprechenden mRNA auf mind. 30 % (siehe Abb. 3.2A oben). Vergleichend zum ersten Screening konnten die Periodenphänotypen der Einzeldepletionen weitestgehend reproduziert werden, wobei die Effekte deutlich stärker ausgeprägt waren. Vermutlich wurde aufgrund der Durchführung in einem größeren Zellkulturformat eine höhere Viruslast und damit eine eventuell stärkere Effizienz der mRNA-Depletion erreicht. Für *Pp2A* und *Pp7* konnten durch die Mehrfachdepletion der katalytischen Untereinheiten deutlich verstärkte Periodeneffekte detektiert werden, allerdings kann zwischen redundanten und additiven Effekten nicht diskriminiert werden. Auch für *Pp1* und *Pp3* ist es schwierig bezüglich redundanten Funktionen der katalytischen Untereinheiten eine Aussage zu treffen und impliziert womöglich komplexe Regulationsmechanismen. Interessanterweise waren für *Pp2A*, *Pp3* und *Pp7* sehr starke Amplitudenreduktionen zu beobachten. Das deutet daraufhin, dass Ser/Thr-Phosphatasen nicht nur zwangsläufig die Geschwindigkeit der Oszillation modulieren können, sondern deren Aktivität auch generell für eine robuste Oszillation von Bedeutung ist.

Generell zeigte sich in beiden Screenings eine Vielzahl von unterschiedlichen Phänotypen, was darauf schließen lässt, dass Ser/Thr-Phosphatasen maßgeblich im circadianen Uhrmechanismus eingreifen. Die Auswahl der potentiellen Kandidaten, deren regulative Funktion in Folgeexperimenten untersucht werden sollten, beschränkte sich primär auf PP2A und PP4c. Insbesondere erschienen diese Phosphatasen von besonderem Interesse, da sie in *Neurospora* und *Drosophila* bereits mit der circadianen Uhr assoziiert wurden und es naheliegt, dass spezieübergreifend Funktionen der posttranslationalen Mechanismen auch in der circadianen Uhr von Säugern existieren. Außerdem weisen interessanterweise beide Phosphatasen große Sequenzhomologien auf, scheinen aber unterschiedliche Funktionen im circadianen Uhrmechanismus zu vermitteln, was sich in den unterschiedlichen circadianen Phänotypen manifestiert: Während für *Pp2A* eine starke Amplitudenreduktion zu sehen



**Abb. 3.2: Funktionelle Redundanz der katalytischen Ser/Thr-Phosphatase-Isoformen im circadianen Oszillator.**

(A) RNAi-basiertes Screening in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen nach veränderten Perioden- und Amplituden-Phänotypen von katalytischen Phosphatase Untereinheiten, deren Isoformen (*ca*, *cb* oder *cc*) entweder einzeln oder in den angegebenen Kombinationen depletiert wurden. Getestet wurden die in Abb. 3.1 A rot markierten shRNA-Konstrukte für *Pp1*, *Pp2*, *Pp3* und *Pp7*. Jeder Punkt repräsentiert die Periodenabweichung (schwarze Kreise, Primär-Achse) bzw. Amplitudenabweichung (rote Kreise, Sekundär-Achse) zur mittleren Periode der Kontroll-shRNA von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes  $\pm$  Standardabweichung. (oben) Die mRNA-Expression der katalytischen Phosphatase Untereinheiten nach jeweiliger Depletion in Prozent, relativ zur Genexpression der Kontroll-shRNA (für *Pp1*/*Pp2*, Mittelwert ( $n=3$ )  $\pm$  SD, für *Pp3*/*Pp7* ( $n=1$ )). (B) Die trendeliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen aus A für die Depletion aller Isoformen der entsprechenden Ser/Thr-Phosphatasen.

ist, wenn beide Isoformen der katalytischen Untereinheiten depletiert werden, zeigt die Depletion von *Pp4c* eine signifikante Periodenverkürzung, die aus bisher noch ungeklärten Gründen in der circadianen Uhr von Säugern bei Depletion von Uhrgenen nur sehr selten zu finden ist [Zhang et al., 2009; Maier et al., 2009].

Die Untersuchungen zur mechanistischen Rolle von PP2A bei der Generierung circadianer Oszillationen sind im Anhang Kapitel 3 zusammengefasst. Durch ein systematisches RNAi-Screening von regulatorischen Untereinheiten von PP2A nach veränderten circadianen Phänotypen, konnte PP2R2B identifiziert werden, welche mit dem essentiellen Uhrprotein PER2 interagiert und vermutlich dessen Proteinstabilität moduliert.

Die experimentelle Analyse einer potentiellen regulativen Funktion von PP4c im molekularen Uhrmechanismus wird in den folgenden Kapiteln beschrieben (siehe Kapitel 3.2 und 3.3).

### 3.2 PP4C MODULIERT DIE CIRCADIANE OSZILLATIONSDYNAMIK

Mittels eines RNAi-basierten Screenings in oszillierenden humanen Zellen wurde untersucht, ob sich die gezielte Depletion von katalytischen Untereinheiten der Serin/Threonin-Phosphatasen auf die circadiane Oszillationsdynamik auswirkt (siehe Kapitel 3.1). Dabei konnte u. a. gezeigt werden, dass die RNAi vermittelte Depletion der katalytischen Untereinheit von Protein Phosphatase 4 (*Pp4c*) zu einer signifikant kürzeren circadianen Periode führt. Eine regulative Rolle von PP4c ist bisher nur im circadianen Modellorganismus *Neurospora* beschrieben worden: Einerseits wird durch PP4c-vermittelte Dephosphorylierung FREQUENCY stabilisiert, andererseits wird die nukleäre Akkumulation und die Bindung an die DNA der positiven Transkriptionsfaktoren (WHITE COLLAR COMPLEX 1/2) begünstigt (siehe Kapitel 1.6.2). Dagegen gibt es bisher keinerlei Hinweise in der Literatur für eine funktionelle Relevanz von PP4c in der circadianen Uhr von Säugern.

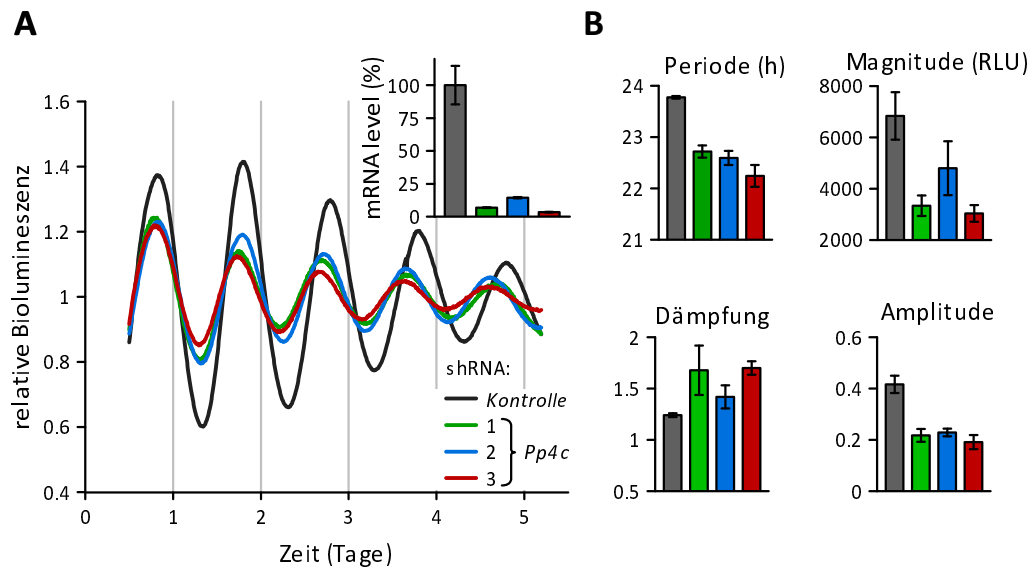
Um eine potentielle Funktion von PP4c für die posttranslationale Kontrolle des molekularen Säugetier-Oszillators zu untersuchen, stand zunächst eine spezie- und gewebeübergreifende Validierung des im Screening gefundenen Phänotyps, und die Analyse, inwiefern eine Reduktion oder Erhöhung der *Pp4c* Gendosis spezifisch die Oszillationsdynamik beeinflusst, im Vordergrund (siehe Kapitel 3.2.1 bis 3.2.4).

### 3.2.1 RNAi VERMITTELTE *Pp4c*-DEPLETION IN HUMANEN ZELLEN

Zunächst sollte der im RNAi-basierten Screening gefundene kurze Periodenphänotyp nach mRNA-Depletion von *Pp4c* in einem größeren Zellkulturformat und zusätzlich in verschiedenen U-2 OS basierten Reportersystemen reproduziert werden.

Für die Validierung wurden sowohl die bereits im Screening verwendeten U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen, als auch U-2 OS/*Per2-Luciferase* Reporterzellen, deren *Luciferase*-Expression von einem *Per2*-Promotorfragment getrieben wird, in 35 mm-Zellkultur-schalen lentiviral mit einer nicht-gerichteten Kontroll-shRNA und jeweils drei shRNA-Konstrukten gegen *Pp4c* transduziert. Ausgewählt wurden dabei diejenigen shRNA-Konstrukte gegen *Pp4c*, die im Screening (siehe Abb. 3.1 und Anhang Tab. 1) die stärksten Periodenveränderungen gezeigt haben. Die Luciferase-Aktivität wurde in den lebenden Zellen über mehrere Tage kontinuierlich gemessen und die Oszillationsdynamik hinsichtlich der Parameter Periode, Magnitude, Dämpfung und Amplitude ausgewertet. Zusätzlich wurden die Zellen im Anschluss an die Biolumineszenzmessung zur Quantifizierung der Effizienz der mRNA-Depletion geerntet.

Sowohl in den U-2 OS/*Bmal1*- als auch in U-2 OS/*Per2-Luciferase* Reporterzellen führte die *Pp4c* mRNA-Depletion zu signifikant verkürzten Perioden von ca. 1-1,5 h (siehe Abb. 3.3) bzw. 0,5-1 h (siehe Anhang Abb. 2). Die verwendeten shRNA-Konstrukte wiesen dabei eine starke mRNA-Depletionseffizienz auf und resultierten in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen in einer Reduktion der *Pp4c* mRNA-Expression um ca. 90-98 % (siehe Abb. 3.3A). Dabei korrelierte die Effizienz der mRNA-Depletion mit der Veränderung der verschiedenen Parameter der Oszillationsdynamik, wobei Konstrukt 3 die deutlichsten Effekte zeigte (siehe Abb. 3.3B). Neben der signifikanten Periodenverkürzung konnte ebenfalls die Reduktion der mittleren Magnitude der Biolumineszenz und der Amplitude der Oszillation, sowie eine gesteigerte Dämpfungsrate in den *Pp4c* depletierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse die im Phosphatase-Screening gefundene Periodenverkürzung bei Reduktion der *Pp4c* Gendosis und unterstreichen damit eine funktionelle Relevanz von PP4c im circadianen Uhrmechanismus.



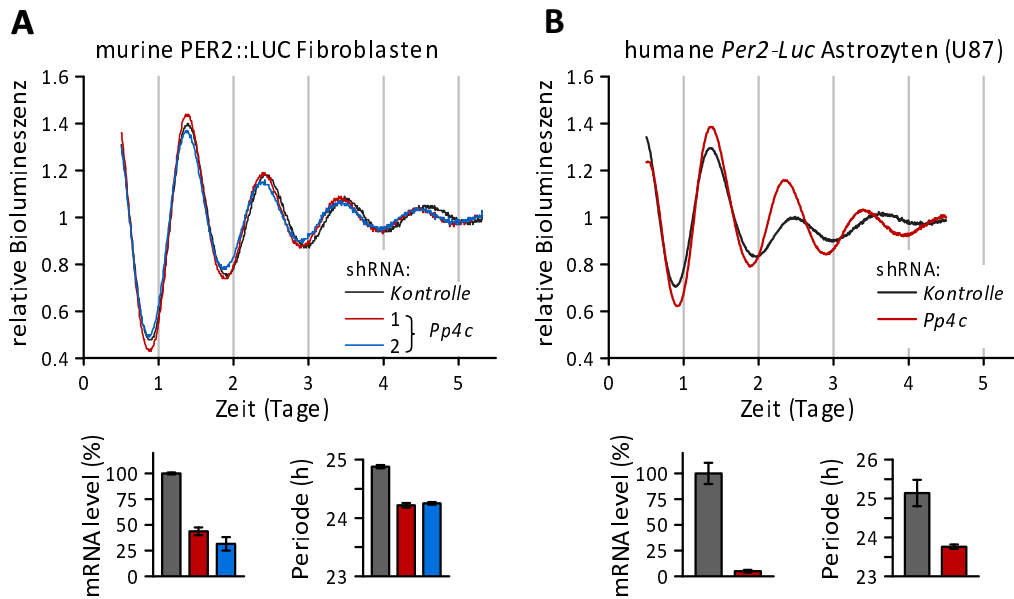
**Abb. 3.3: Genetische Depletion von *Pp4c* verkürzt die circadiane Periode in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen.**

**(A)** Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen bei genetischer Depletion von *Pp4c* mittels RNAi. Für jedes shRNA-Konstrukt gegen *Pp4c* (1-3, entspricht der Farbkodierung in Anhang Tab. 1) wurde nach der Biolumineszenzmessung die Effizienz der Herunterregulation von *Pp4c* mRNA mittels RT-qPCR analysiert und relativ zur Kontroll-shRNA dargestellt. **(B)** Auswertung der Parameter Periode, Magnitude, Dämpfung und Amplitude. Die Farbkodierung der Balken bezieht sich auf die entsprechenden shRNA-Konstrukte in A. (A und B) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes.

### 3.2.2 GEWEBE- UND SPEZIESÜBERGREIFENDE REPRODUKTION DES CIRCADIANEN PHÄNOTYPS

Da es sich bei den U-2 OS Zellen um eine aus einem Osteosarkom immortalisierte Zelllinie handelt [Ponten und Saksela, 1967], die chromosomal verändert ist und damit womöglich zellspezifische, genetische Veränderungen in bestimmten Zellfunktionen aufweist, sollte weiterhin untersucht werden, ob sich der durch *Pp4c* mRNA-Depletion induzierte kurze Periodenphänotyp auch in anderen humanen Zellen und in verschiedenen Spezies reproduzieren lässt.

Um die speziesübergreifenden Effekte von PP4c zu untersuchen, wurden primäre murine Fibroblasten aus einer transgenen PER2::LUC-Maus isoliert, die über den endogenen, rhythmisch aktiven *Per2*-Promotor ein Fusionsprotein aus PER2 und Luciferase exprimieren. In diesen Fibroblasten wurden jeweils zwei gegen murine *Pp4c* gerichtete



**Abb. 3.4: Genetische Depletion von *Pp4c* verkürzt die circadiane Periode in primären PER2::LUC Mausfibroblasten und einer humanen *Per2-Luciferase* Astrozyten Zelllinie.**

Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in primären PER2::LUC Mausfibroblasten (A) bzw. in humanen Astrozyten (U87) mit einem *Per2-Luciferase* Reporter (B) bei genetischer Depletion von *Pp4c*. Für jedes shRNA-Konstrukt gegen *Pp4c* wurde die Periode der Oszillation bestimmt und nach der Biolumineszenzmessung die Effizienz der Depletion von *Pp4c* mRNA mittels RT-qPCR analysiert und relativ zur Kontroll-shRNA dargestellt. Fehlerbalken in (A) repräsentieren den Bereich von zwei unabhängigen Replikaten eines Experimentes. Für (B) sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes dargestellt. Die Farbkodierung der Balken bezieht sich jeweils auf die entsprechenden shRNA-Konstrukte.

shRNA-Konstrukte und eine nicht-gerichtete Kontroll-shRNA lentiviral transduziert und die Luciferase-Aktivität, die die Oszillation des PER2-Proteins widerspiegelt, über mehrere Tage aufgenommen. Es zeigte sich auch in den murinen Fibroblasten eine Periodenverkürzung von etwa 45 min im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 3.4A). Dabei lag die Reduktion der *Pp4c* mRNA-Expression in den depletierten Zellen nur bei ca. 50-75 %. Durch die damit noch eventuell verbleibende Restaktivität von PP4c, ist vermutlich der circadiane Periodeneffekt in Fibroblasten im Vergleich zu den U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt.

Um zu testen, ob PP4c auch für die Oszillationsdynamik in weiteren humanen Zelltypen essentiell ist, wurde ein Reportersystem gewählt, in dem humane Astrozyten (U87-Zelllinie) Luciferase unter der Kontrolle eines *Per2*-Promotorfragments exprimieren. Diese Astrozyten wurden mit dem shRNA-Konstrukt gegen *Pp4c*, welches in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase*

Reporterzellen den stärksten Periodenphänotyp gezeigt hat (Konstrukt 3, siehe Abb. 3.3), lentiviral transduziert. Auch hier zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Periodenverkürzung von ca. einer Stunde bei einer sehr effizienten *Pp4c* mRNA-Depletion von über 90 % (siehe Abb. 3.4B).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sich die durch *Pp4c*-Depletion induzierte Periodenverkürzung sowohl in unterschiedlichen Spezies, als auch in verschiedenen humanen Zelltypen reproduzieren lässt und weisen auf einen grundlegenden essentiellen Mechanismus von PP4c in der circadianen Säugetier-Uhr hin.

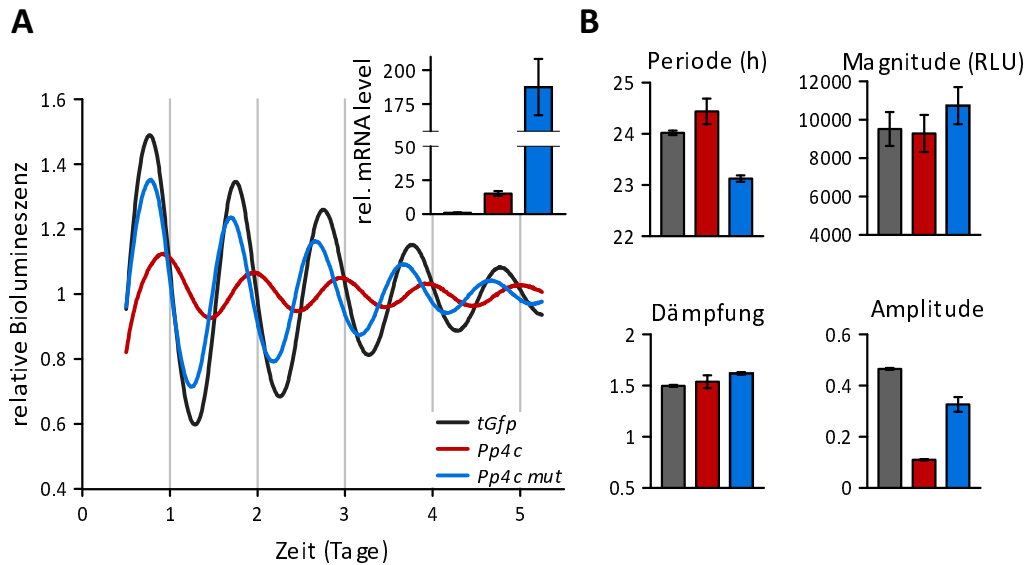
### 3.2.3 ÜBEREXPRESSION VON WILDTYPISCHER *Pp4c* UND EINER DOMINANT NEGATIVEN MUTANTE

Vor dem Hintergrund, dass die durch mRNA-Depletion verringerte Genexpression von *Pp4c* zu einer signifikanten Veränderung der Oszillationsdynamik und einer kurzen Periode der Oszillation führt, sollte untersucht werden, inwiefern im Gegensatz dazu eine erhöhte Genexpression von *Pp4c* die circadiane Oszillation moduliert.

Dazu wurde in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen entweder wildtypische *Pp4c* oder als Kontrolle *tGfp* ektopisch überexprimiert und die Oszillationsdynamik der Luciferase-Aktivität über mehrere Tage vergleichend untersucht. Die Überexpression von wildtypischer *Pp4c* resultierte in einer ca. 12 fachen Erhöhung der *Pp4c* mRNA-Expression und zeigte eine leichte Tendenz zur Periodenverlängerung. Vor allem die Amplitude der Oszillation war drastisch reduziert (siehe Abb. 3.5), was sich auch in U-2 OS/*Per2-Luciferase* Reporterzellen bestätigen ließ (siehe Anhang Abb. 3).

Desweiteren wurde PP4c durch einen einzigen Aminosäureaustausch an Position 236 von Arginin zu Leucin derart mutiert, dass eine dominant-negative Mutante entsteht (PP4c mut), die keine PP4c-Aktivität mehr aufweist [Zhou et al., 2002]. Analog zum vorherigen Experiment wurde *PP4c mut* ebenfalls in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen ektopisch überexprimiert und die Oszillationsdynamik bewertet. Die Überexpression der dominant-negativen Mutante führte zu einer um ca. 1 h verkürzten Periode im Vergleich zur Kontrolle und bestätigt damit, dass die Reduktion der endogenen PP4c-Aktivität – sowohl durch mRNA-Depletion von *Pp4c*, als auch durch Überexpression einer dominant-negativen *Pp4c* Mutante – einen entscheidenden Einfluss auf die Periodenlänge hat.





**Abb. 3.5: Ektopische Überexpression von *Pp4c* und einer dominant-negativen *Pp4c* Mutante beeinflussen die Oszillationsdynamik in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen.**

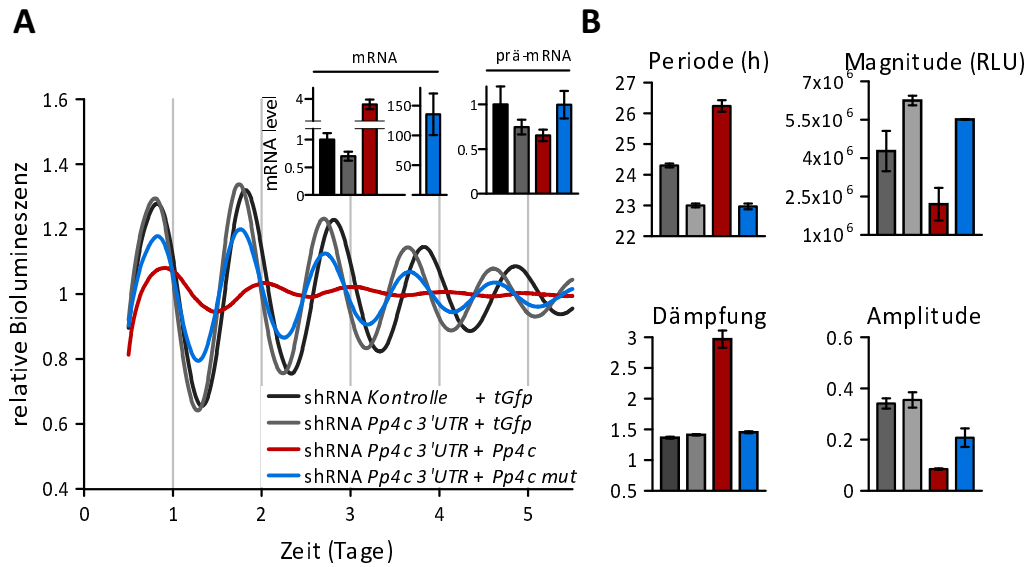
**(A)** Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen bei Überexpression von *Pp4c* (rot) bzw. einer dominant-negativen Mutante *Pp4c mut* (blau) im Vergleich zur *tGfp*-Kontrolle. Nach der Biolumineszenzmessung wurde die Effizienz der *Pp4c* mRNA Überexpression mittels RT-qPCR analysiert und relativ zur *tGfp*-Kontrolle dargestellt. **(B)** Auswertung der Parameter Periode, Magnitude, Dämpfung und Amplitude. Die Farbkodierung der Balken bezieht sich auf die entsprechende Überexpression (*tGfp*, *Pp4c* oder *Pp4c mut*) in A.

(A und B) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes.

### 3.2.4 WIEDERHERSTELLUNG DER WILDTYPISCHEN PERIODE IN *Pp4c* DEPLETIERTEN ZELLEN

Wenn die Effekte der shRNA-Konstrukte gegen *Pp4c* tatsächlich und ausschließlich auf *Pp4c* mRNA-Depletion – und nicht auf andere unspezifische Effekte – zurückzuführen sind, dann sollte die ektopische Überexpression von wildtypischer *Pp4c* den durch die mRNA-Depletion von *Pp4c* induzierten kurzen Perioden-Phänotyp wieder revertieren können.

Um dies zu testen wurde in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen die endogene *Pp4c* mRNA durch Verwendung einer spezifischen shRNA, die gegen die 3'UTR von *Pp4c* gerichtet ist, depletiert. Als Kontrolle diente eine nicht-gerichtete Kontroll-shRNA. In diesem Hintergrund wurden dann entweder *tGfp* als Kontrolle, wildtypische *Pp4c* oder die dominant-negative *Pp4c* Mutante ektopisch überexprimiert und die Oszillationsdynamik



**Abb. 3.6: Ektopische Überexpression von *Pp4c*, nicht aber von der dominant-negativen Mutante, revertiert den kurzen Periodenphänotyp bei *Pp4c*-Depletion.**

**(A)** Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen. Zur Depletion endogener *Pp4c* mRNA wurde eine gegen die 3'UTR von *Pp4c* gerichtete shRNA verwendet, als Kontrolle diente eine Kontroll-shRNA. In diesem Hintergrund wurde entweder *tGfp* (grau), *Pp4c* (rot) oder *Pp4c* mut (blau) ektopisch überexprimiert. Nach der Biolumineszenzmessung wurde die *Pp4c* mRNA und prä-mRNA in den Ansätzen mittels RT-qPCR analysiert und relativ zur Kontrolle dargestellt. **(B)** Auswertung der Parameter Periode, Magnitude, Dämpfung und Amplitude. Die Farbkodierung der Balken bezieht sich auf die entsprechenden Ansätze in A.

(A und B) Fehlerbalken repräsentieren den Bereich von zwei unabhängigen Replikaten eines Experimentes.

vergleichend untersucht. Zusätzlich wurden im Anschluss an die Biolumineszenzmessung die Zellen zur Quantifizierung der mRNA und prä-mRNA geerntet.

Die mRNA-Depletion von *Pp4c* zeigte trotz einer relativ schwachen Depletionseffizienz von nur etwa 25 % im Vergleich zur Kontroll-shRNA wie in den vorherigen Experimenten eine Periodenverkürzung von etwa einer Stunde (siehe Abb. 3.6). Während die Überexpression der *Pp4c* Mutante die Periodenverkürzung in den *Pp4c* depletierten Zellen nicht beeinflusste, zeigte die Überexpression von wildtypischer *Pp4c* eine Reversion des kurzen Periodenphänotyps. Dabei wurde allerdings die normale circadiane Periode nicht wiederhergestellt, sondern es manifestierte sich vielmehr der Phänotyp der Überexpression von *Pp4c* mit einer starken Amplitudenreduktion, erhöhten Dämpfungsrates und Periodenverlängerung (vgl. Abb. 3.5). Das könnte daraufhin deuten, dass die, durch *Pp4c*-Depletion und -Überexpression, induzierten Phänotypen nicht über den gleichen Mechanismus vermittelt werden. Da allerdings die Überexpression der dominant-negativen Mutante – die, wie bereits gezeigt wurde, auch

in einer 1-stündigen Periodenverkürzung resultiert – keinen additiven Periodeneffekt auf die durch die *Pp4c* mRNA-Depletion induzierte Periodenverkürzung hat, kann angenommen werden, dass dem *Pp4c* Überexpressions- und mRNA-Depletionsphänotyp ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt.

Die Quintessenz der bisherigen Untersuchungen ist, dass eine veränderte *Pp4c* Gendosis und Aktivität die circadiane Oszillationsdynamik – dabei vor allem die Periode und die Amplitude der Oszillation – substanziell beeinflusst. Darüber hinaus lässt sich die kurze Periode bei RNAi-vermittelter mRNA-Depletion der katalytischen Untereinheit von *Pp4c* spezies- und gewebeübergreifend mit unterschiedlichen Reportersystemen reproduzieren. Dies stützt damit die Hypothese, dass PP4c ein fundamentaler Regulator der circadianen Uhr in Säugetieren ist.

### 3.3 MECHANISTISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONELLEN RELEVANZ VON PP4C FÜR DIE REGULATION DER CIRCADIANEN UHR

Die bisherigen Ergebnisse der spezifischen mRNA-Depletion und der ektopischen Überexpression von *Pp4c* in oszillierenden Zellen haben gezeigt, dass die *Pp4c* Gendosis – die sehr wahrscheinlich das Level der Phosphatase-Aktivität repräsentiert – entscheidend für die Aufrechterhaltung einer normalen circadianen Oszillationsdynamik ist (siehe Kapitel 3.2). Um einen ersten Anhaltspunkt zu finden, wie PP4c regulativ im molekularen Uhrmechanismus fungieren könnte, wurde zunächst untersucht, inwiefern sich eine veränderte *Pp4c* Gendosis auf die circadiane Expression von Uhrgenen auswirkt (siehe Kapitel 3.3.1). Häufig korrelieren veränderte Genexpressionsprofile von Uhrgenen mit einer veränderten Oszillationsdynamik. Ausgehend von den daraus gewonnenen Erkenntnissen wurden anschließend mechanistische Hypothesen formuliert, die durch gezielte Experimente bestätigt oder falsifiziert werden sollten (siehe Kapitel 3.3.3 bis 3.3.7).

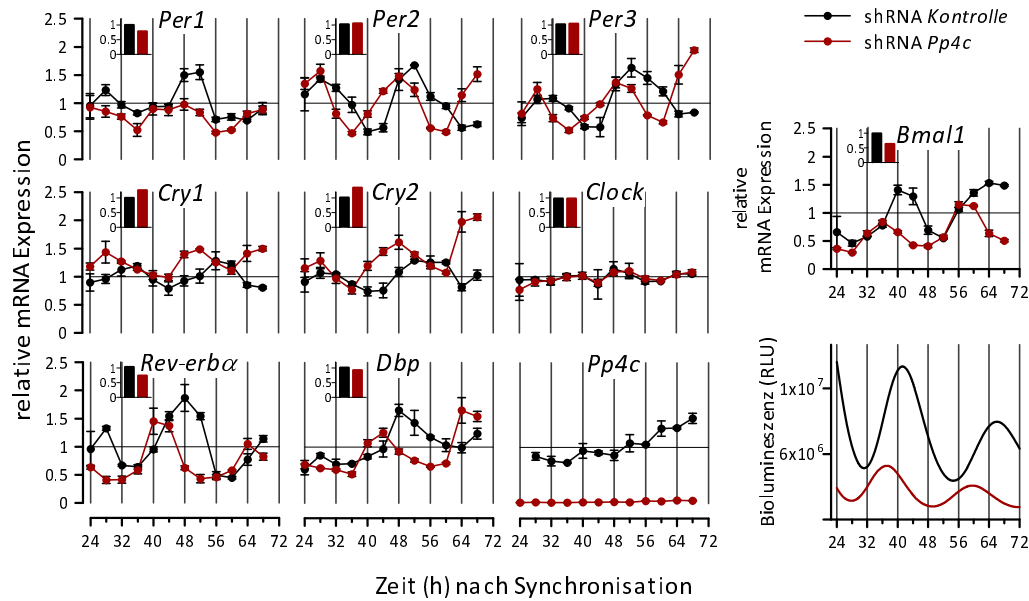
#### 3.3.1 DIE GENDOSIS VON *Pp4c* BEEINFLUSST DIE CIRCADIANE EXPRESSION VON UHRGENEN

Bei den bisherigen Untersuchungen diente zum Auslesen der Oszillationsdynamik der circadianen Uhr auf molekularer Ebene ausschließlich das Transkriptionsverhalten eines

*Bmal1*- oder *Per2*-Promotorfragments in verschiedenen Zelltypen, bzw. für die primären *Per2::LUC* Fibroblasten die Abundanz des Fusionsproteins. Beide methodischen Ansätze helfen allerdings nur bedingt bei der Aufklärung eines potentiellen Mechanismus von PP4c, der für die beschriebenen Periodenveränderungen verantwortlich ist. Ein wesentlicher Bestandteil einer circadianen Oszillation ist die rhythmische Transkription verschiedener Uhrgene. Zwar sind weitere Regulationsmechanismen, wie Translation und posttranslationale Modifikationen von Uhrproteinen, für die Aufrechterhaltung der Oszillationsdynamik ebenso essentiell, es können sich aber in einem rückgekoppelten System, wie der circadianen Uhr, immer auch rückwirkende Effekte auf die Transkription von bestimmten Genen zeigen. Um einen Einblick in eine mögliche Wirkungsweise von PP4c bei der Generierung des circadianen Rhythmus zu bekommen, wurde die circadiane mRNA-Expression von Uhrgenen in Abhängigkeit von einer veränderten Gendosis von *Pp4c* untersucht.

Dazu wurde in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen mittels lentiviraler Transduktion entweder *Pp4c* auf mRNA Ebene durch Verwendung einer spezifischen shRNA gegen die katalytische Untereinheit spezifisch depletiert oder ektopisch überexprimiert. Als Kontrollen fungierten dabei die Expression einer nicht-gerichteten Kontroll-shRNA bzw. *tGfp*. Zu Beginn des Experimentes wurden die stabil transduzierten und selektierten Zellen mit Dexamethason synchronisiert und anschließend über einen Zeitraum von 48 h in 4 h-Intervallen für die RNA-Extraktion geerntet. Mittels RT-qPCR wurden die Genexpressionslevel relevanter Uhrgene und *Pp4c* zu unterschiedlichen Zeiten analysiert (siehe Abb. 3.7 und 3.8).

Entsprechend der Ergebnisse der Luciferase-Aktivitätsmessungen in Reporterzellen, manifestierte sich die durch mRNA-Depletion von *Pp4c* induzierte verkürzte Periode ebenso in der Genexpression der untersuchten oszillierenden Uhrgene (siehe Abb. 3.7). Dabei lag die Effizienz der *Pp4c* mRNA-Depletion über den gesamten experimentellen Zeitraum anhaltend bei etwa 98 %. In den Phasenbeziehungen der Gene untereinander, wie z. B. einem antiphasischen Verhalten von E-box regulierten Genen, wie *Dbp*, und dem Aktivator von E-Boxen *Bmal1*, gab es keine Auffälligkeiten. Allerdings waren die mittleren Magnituden der Genexpression in den *Pp4c* depletierten Zellen für die Uhrgene *Per1* und *Rev-erba* tendenziell reduziert und für *Cry1/2* erhöht, wobei sich überwiegend zu Zeitpunkten der maximalen Genexpression die deutlichsten Veränderungen zeigten. Die

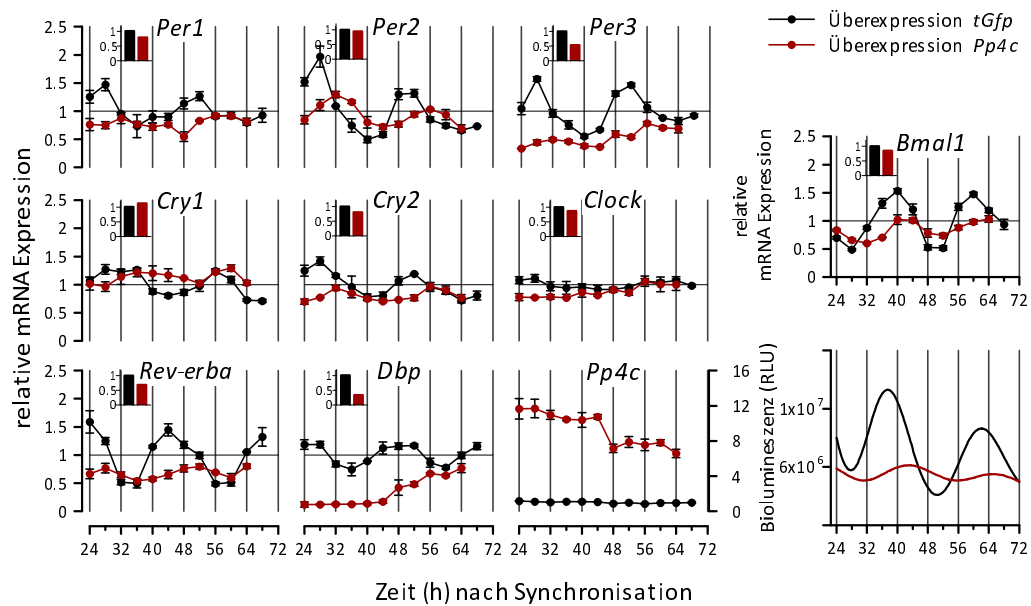


**Abb. 3.7: Reduktion der *Pp4c* Gendosis beeinflusst die Expression von endogenen Uhrigen.** Humane U-2 OS/*Bmal1*-Luciferase Reporterzellen wurden lentiviral entweder mit einer Kontroll-shRNA (schwarze Kreise) oder einer shRNA gegen *Pp4c* (rote Kreise) transduziert. Selektionierte Zellen wurden ausgesät und die RNA 24 h nach Dexamethason-Synchronisation in 4 h-Intervallen über einen Zeitraum von 48 h extrahiert. Die Genexpressionslevel von Uhrigen und *Pp4c* wurden mittels RT-qPCR analysiert. Die Quantifizierung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durch Normalisierung auf *Gapdh* und relativ zur mittleren Expression aller Zeitpunkte der Kontrollzellen. Pro Zeitpunkt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes dargestellt. Die Balkendiagramme visualisieren die mittlere Genexpression über den gesamten experimentellen Zeitraum. **(rechts)** Die relative *Bmal1* mRNA-Expression (oben) spiegelt die durch den *Bmal1*-Promotor getriebene Luciferase-Aktivität in der Periode und Magnitude (unten) wider.

Unterschiede waren jedoch generell nur sehr schwach ausgeprägt, was keinen grundlegenden mechanistischen Hinweis liefert. Allein die Oszillation der *Bmal1*-Expression zeigte eine deutlich niedrigere Amplitude und etwa 2-fache Reduktion der mittleren Genexpression, was mit der reduzierten *Bmal1*-Promotor getriebenen Luciferase-Aktivität in Reporterzellen korrelierte.

Die ektopische Überexpression von *Pp4c* resultierte in einer drastischen Amplitudenreduktion der rhythmisch transkribierten Uhrigen und reflektiert damit den in den U-2 OS/*Bmal1*-Luciferase Reporterzellen circadianen Phänotyp (siehe Abb. 3.8). Dabei war vor allem auch die mittlere Genexpression der charakteristischen E-Box getriebenen Gene wie *Per3* und *Dbp* stark reduziert, während die Magnitude von *Bmal1* im Gegensatz zur *Pp4c* mRNA-Depletion keine Veränderungen zeigte.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass eine veränderte *Pp4c* Gendosis un-



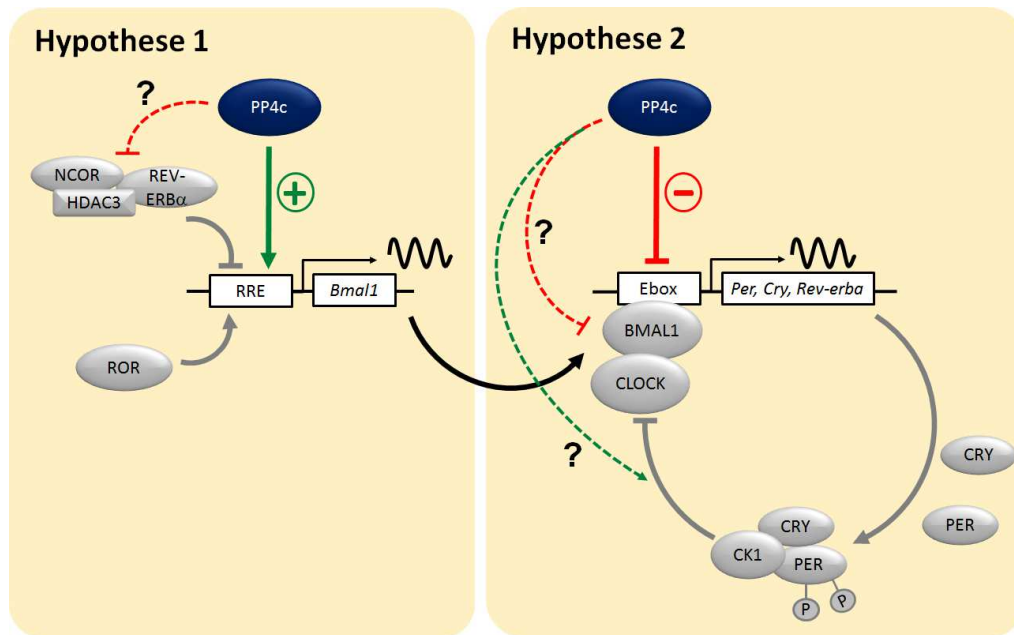
**Abb. 3.8: Ektopische Überexpression von *Pp4c* beeinflusst die Amplitude der circadianen Uhrgen-Expression.**

Humane U-2OS/*Bmal1*-Luciferase Reporterzellen wurden lentiviral entweder mit *tGfp* (schwarze Kreise) oder *Pp4c* (rote Kreise) transduziert. Selektionierte Zellen wurden ausgesät und die RNA 24 h nach Dexamethason-Synchronisation in 4-h-Intervallen über einen Zeitraum von 48 h extrahiert. Die Genexpressionslevel der Uhrgene und *Pp4c* wurden mittels RT-qPCR analysiert. Die Quantifizierung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durch Normalisierung auf *Actin* und relativ zur mittleren Expression aller Zeitpunkte der Kontrollzellen. Pro Zeitpunkt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes dargestellt. Die Balkendiagramme visualisieren die mittlere Genexpression über den gesamten experimentellen Zeitraum. **(rechts)** Die relative *Bmal1* mRNA-Expression (oben) spiegelt die durch den *Bmal1*-Promotor getriebene Luciferase-Aktivität in der Amplitude (unten) wider.

terschiedliche Auswirkungen auf die Uhrgenexpression hat. Ausgehend von den daraus resultierenden Erkenntnissen, wurden im Folgenden zwei hypothetische Arbeitsmodelle entwickelt, wie PP4c in den molekularen Uhrmechanismus eingreifen könnte. (siehe Kapitel 3.3.2).

### 3.3.2 ENTWICKLUNG HYPOTHETISCHER ARBEITSMODELLE FÜR DIE ROLLE VON PP4C IN DER CIRCADIENEN UHR

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine veränderte *Pp4c* Genodosis durch spezifische mRNA-Depletion bzw. Überexpression 1.) zu unterschiedlichen circadianen Phänotypen führt, die sich sowohl in der Oszillationsdynamik in verschiedenen Reporterzellen, als auch auf Ebene der rhythmischen Transkription von Uhrgenen



**Abb. 3.9: Hypothetische Arbeitsmodelle für die funktionelle Rolle von PP4c in der circadianen Uhr.**

Aus der circadianen Genexpressionsanalyse von Uhrgenen in Abhängigkeit von einer veränderten Gendosis von *Pp4c* (siehe Kapitel 3.3.1) konnten zwei mechanistische Arbeitshypothesen für eine potentielle funktionelle Rolle von PP4c in der circadianen Säugetier-Uhr abgeleitet werden. **(Hypothese 1)** Innerhalb der positiven Rückkopplungsschleife könnte PP4c über das cis-regulatorische Enhancer Element einen direkten Einfluss auf den *Bmal1*-Promotor haben und auf die *Bmal1*-Transkription aktivierend wirken (grüner Pfeil). Eine Theorie dabei ist, dass PP4c durch Inhibition des repressori-schen HDAC3/N-CoR1/REV-ERB $\alpha$ -Komplexes die *Bmal1*-Transkription fördert (rot gestrichelter Pfeil). Ein Anhaltspunkt dafür ist, dass PP4c bekanntermaßen die HDAC3-Aktivität inhibieren kann **(Hypothese 2)** Innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife könnte PP4c inhibierend auf die E-Box getriebene Transkription von Uhrgenen wirken (roter Pfeil). Dabei könnte PP4c als Inhibitor der CLOCK/BMAL1-vermittelten Transaktivierung von E-Box getriebenen Uhrgenen fungieren (rot gestrichelter Pfeil) oder die Funktion des inhibitorischen Komplexes der negativen Komponenten verstärken (grün gestrichelter Pfeil).

manifestieren und 2.) zu differentiellen mittleren Expressionsleveln von Uhrgenen führt.

Da der circadiane Uhrmechanismus auf einem sehr komplexen und fein justierten Netzwerk aus transkriptions- und translations-getriebenen Rückkopplungsschleifen beruht, und damit eine Ursache nicht linear zu einem Effekt führen muss, sondern sich vielmehr ein reguliertes Fließgleichgewicht zwischen den einzelnen Prozessen einstellt, ist es schwierig aus den Untersuchungen der Genexpression einen einzigen fundamentalen PP4c-Mechanismus abzuleiten. Wenn man dagegen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse entkoppelt voneinander betrachtet, resultieren daraus zwei mechanistische Arbeitsmodelle, wie PP4c innerhalb des circadianen Uhrmechanismus wirken könnte (siehe Abb. 3.9). Dabei müssen

sich aber beide Hypothesen nicht notwendigerweise gegenseitig ausschließen.

#### HYPOTHESE 1

Die spezifische *Pp4c* mRNA-Depletion wirkt auf die *Bmal1*-Transkription inhibierend (vgl. Abb. 3.7). Das deutet darauf hin, dass PP4c möglicherweise eine direkte aktivierende Funktion auf den *Bmal1*-Promotor ausübt, was dann infolgedessen indirekt auch die Transkription von E-Box getriebenen Uhrgenen begünstigen könnte (siehe Abb. 3.9 links). Eine Möglichkeit dabei ist, dass PP4c innerhalb der positiven Rückkopplungsschleife, in der sowohl die Aktivatoren ROR( $\alpha/\beta/\gamma$ ) als auch der HDAC3/N-CoR1/REV-ERB $\alpha$ -Repressorkomplex kompetitiv am cis-regulatorischen RRE-Element im *Bmal1*-Promotor binden, durch Inhibition des Repressorkomplex die *Bmal1*-Transkription positiv reguliert. Ein Anhaltspunkt für diese Hypothese ist in der Literatur beschrieben: In einem nicht circadianen Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass PP4c die HDAC3-Aktivität durch Dephosphorylierung einer spezifischen Phosphorylierungsstelle inhibiert [Zhang et al., 2005]. Eine verringerte *Pp4c*-Expression (z. B. durch RNAi-vermittelte mRNA-Depletion) würde dementsprechend zu einer stärkeren HDAC3-Aktivität führen und könnte so die repressorische REV-ERB $\alpha$ -Aktivität am *Bmal1*-Promotor verstärken. So ließe sich die verringerte *Bmal1*-Expression der *Pp4c*-depletierten Zellen erklären (siehe Abb. 3.7).

#### HYPOTHESE 2

Die Überexpression von *Pp4c* resultierte in einer zum Teil drastischen Repression der Amplituden und Magnituden von E-Box kontrollierten Genen (vgl. Abb. 3.8). Das führt zu der Hypothese, dass PP4c direkt auf die E-Box getriebene Uhrgenexpression inhibierend wirken könnte (siehe Abb. 3.9 rechts). Dabei sind verschiedene potentielle Wirkungsweisen von PP4c denkbar: Einerseits könnte PP4c als Inhibitor der CLOCK/BMAL1-vermittelten Transaktivierung von E-Box getriebenen Uhrgenen fungieren, beispielsweise durch Verhinderung der Bindung von CLOCK/BMAL1 an die DNA oder durch Reduktion der transkriptionellen Aktivität des CLOCK/BMAL1-Komplexes. Andererseits könnte PP4c durch Verstärkung des inhibitorischen Komplexes – zum Beispiel durch Modulation der Interaktion oder Lokalisation von multimeren Proteinkomplexen der negativen Kompo-



nenten oder der Regulation der Stabilität der Uhrproteine – innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife agieren.

### 3.3.3 PP4C WIRKT AKTIVIEREND AUF DEN *Bmal1*-PROMOTOR UND MODULIERT DIE BINDUNG VON HDAC3

Vor dem Hintergrund der bisherigen Ergebnisse, dass eine verminderte oder gesteigerte PP4c-Aktivität mit fundamentalen Veränderungen des Oszillationsverhaltens in lebenden Zellen einhergeht und auf molekularer Ebene die rhythmische Expression von Uhrgenen unterschiedlich beeinflusst, ließen sich zwei mechanistische Arbeitshypothesen ableiten (siehe Kapitel 3.3.2 und Abb. 3.9), wie PP4c im molekularen Uhrmechanismus eingreifen könnte. Zunächst wurde Hypothese 1 getestet, ob PP4c einen direkten regulatorischen Einfluss auf die *Bmal1*-Transkription hat.

#### PP4C VERSTÄRKT DIE TRANSAKTIVIERUNG VON RORC AN RRE ENHANCER-ELEMENTEN

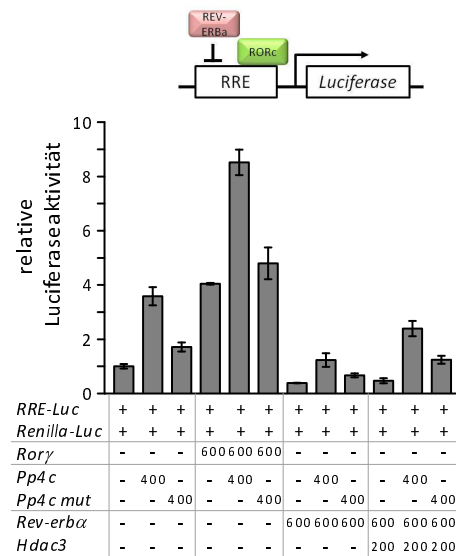
Um einen direkten regulatorischen Einfluss von PP4c auf die *Bmal1*-Transkription zu testen, wurde ein reduktionistisches, statisches Luciferase-Reportergen-Modell in HEK 293 Zellen gewählt. Dabei liegt der Vorteil der HEK 293 Zellen darin, dass sie keine funktionale circadiane Uhr besitzen und damit keine Rückkopplung von induzierten Effekten auf weitere regulatorische Prozesse innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife, die eventuell ursächliche Effekte maskieren würden, stattfinden kann.

Mittels dieses methodischen Ansatzes wird das Reportergen *Luciferase* unter Kontrolle des Haupt-cis-regulatorischen Elements im *Bmal1*-Promotor – dem RRE-Element – exprimiert, so dass die Luciferase-Aktivität direkt die transkriptionelle Aktivität des Promotorfragments reflektiert. Durch Co-Expression von verschiedenen Komponenten, kann der Einfluss auf die RRE-vermittelte Transkription untersucht werden. Dabei führt die Transfektion der *Ror*( $\alpha/\beta/\gamma$ )-Aktivatoren zu einer Erhöhung, bzw. die Transfektion der Repressoren *Rev-erba*/*Hdac3* zu einer Verminderung der Luciferase-Aktivität. Durch zusätzliche Co-Transfektion von *Pp4c* konnte dann eine direkte Wirkung auf die ROR-vermittelte Transaktivierung am RRE-Element untersucht werden.

HEK 293 Zellen wurden transient mit dem Luciferase-Reportergen-Konstrukt *RRE-*

**Abb. 3.10: Überexpression von *Pp4c* moduliert die Transaktivierung an regulativen RRE-Promotorelementen.**

HEK 293 Zellen wurden mit den Luciferase-Reportergen-Konstrukten *RRE-Luc* (10 ng) und *Renilla-Luc* (2 ng) (jeweils mit + gekennzeichnet) transfiziert. Die entsprechenden Expressionsvektoren wurden in den angegebenen Mengen (ng/Ansatz) co-transfiziert, – bedeutet keine Expression. Nach der Zellyse wurde die Luciferase-Aktivität über das Dual-Luciferase-Assay-System (Promega) bestimmt. Dargestellt sind die Luciferase-Aktivitäten in den einzelnen Ansätzen relativ zur Luciferase-Aktivität des Kontrollansatzes (nur Luciferase-Reporter-Konstrukte). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes.



*Luciferase* und als Transfektionskontrolle *Renilla-Luciferase* transfiziert. Zusätzlich wurden in den verschiedenen kombinierten Ansätzen *Rorγ*, *Rev-erba*, *Hdac3*, wildtypische *Pp4c* und die dominant-negative *Pp4c* Mutante co-exprimiert (siehe Abb. 3.10). Nach 48 h in Kultur wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Aktivität in einem Luminometer gemessen. Dabei wurde für jeden Ansatz die Luciferase-Aktivität des RRE-Reporters auf die entsprechende Renilla-Luciferase-Aktivität normalisiert, um technische Fehler zu minimieren.

Die Expression von *Rorγ* erhöhte erwartungsgemäß die transkriptionelle Aktivität des RRE-Promotors, was sich in einer etwa 4-fachen Induktion der Luciferase-Aktivität äußerte. In Anwesenheit von wildtypischer *Pp4c*, wurde die ROR $\gamma$ -vermittelte Transaktivierung nochmals um den Faktor 2 auf ca. das 8-fache gegenüber der basalen Luciferase-Aktivität gesteigert, während die dominant-negative *Pp4c* Mutante, die keine PP4c-Aktivität aufweist, keine Effekte zeigte. Interessanterweise war wildtypische *Pp4c* bereits ohne zusätzliche *Rorγ*-Transfektion in der Lage, die transkriptionelle Aktivität des RRE-Reporters um ca. das 4-fache zu verstärken. Das könnte darauf hinweisen, dass zelleigene Proteine (z. B. endogenes REV-ERB $\alpha$  und HDAC3) in den HEK 293 Zellen das Reporter-Konstrukt inhibieren und diese Inhibition durch PP4c geschwächt wird.

Die Überexpression des transkriptionellen Repressors *Rev-erba* konnte die transkriptionelle Aktivität des RRE-Promotors ca. zweifach reduzieren. Eine zusätzliche Transfektion

mit dem Co-Repressor *Hdac3* verstärkte diesen Effekt allerdings nicht. Jedoch wurde die inhibitorische Aktivität von REV-ERB $\alpha$  und des REV-ERB $\alpha$ /HDAC3-Komplexes durch gleichzeitige Überexpression von wildtypischer *Pp4c* wieder gegenreguliert, während die dominant-negative *Pp4c* Mutante kaum einen Einfluss zeigte.

Insgesamt ergaben die Untersuchungen, dass die ROR $\gamma$ -vermittelte Transaktivierung des RRE-Elements im *Bmal1*-Promotor durch die PP4c-Aktivität verstärkt wird. Dabei zeigte sich auch eine Repression der inhibitorischen Funktion von REV-ERB $\alpha$  bzw. REV-ERB $\alpha$ /HDAC3, was sich wiederum positiv auf die Transaktivierung auswirkte. Beide Resultate bestärken die Hypothese, dass PP4c aktivierend auf den *Bmal1*-Promotor wirkt. Jedoch kann bisher nicht diskriminiert werden, ob PP4c die ROR $\gamma$  Funktion verstärkt oder den Repressorkomplex inhibiert.

#### PP4C MODULIERT DIE HDAC3-BINDUNG AN RRE ENHANCER-ELEMENTEN

Die Ergebnisse des vorherigen Experimentes, in dem repräsentativ für die *Bmal1*-Transkript-Regulation das statische Verhalten eines artifiziellen Luciferase-Reporters unter der Kontrolle eines RRE-Elementes untersucht wurde, deuten auf eine positive regulatorische Funktion von PP4c auf den *Bmal1*-Promotor hin. Dabei könnte die repressorische Aktivität des REV-ERB $\alpha$ /HDAC3-Komplexes negativ reguliert werden. In der Literatur ist bekannt, dass PP4c die Aktivität von HDAC3 dosisabhängig inhibieren kann [Zhang et al., 2005]. Innerhalb der positiven Rückkopplung rekrutiert REV-ERB $\alpha$  die Co-Repressoren N-CoR1 und HDAC3 an das regulatorische RRE-Element im *Bmal1*-Promotor. Es wird angenommen, dass HDAC3 das Chromatin an speziellen Lysinresten deacetyliert und damit das Chromatin kompakter macht und zu einer verminderten transkriptionellen Promotor-Aktivität führt.

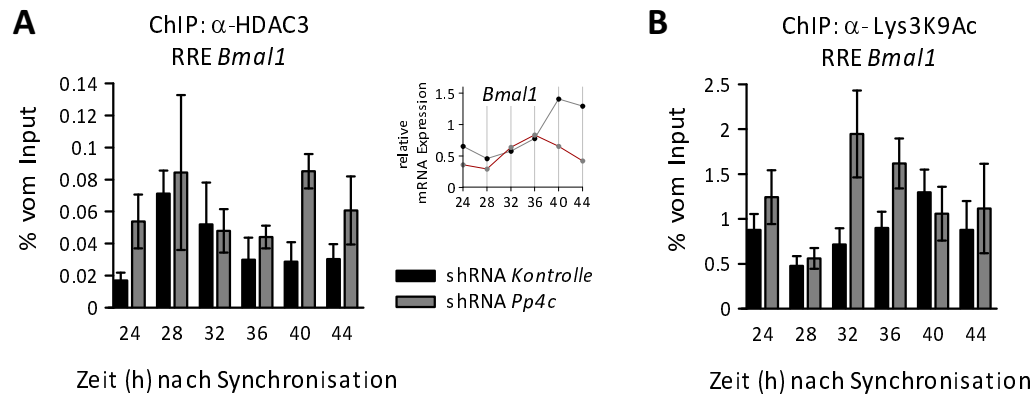
Daher stellte sich die Frage, ob sich eine solche Inhibition der HDAC3-Aktivität durch PP4c mechanistisch auf die circadiane Uhr auswirkt. Denkbar wäre, dass eine Dephosphorylierung von HDAC3 durch PP4c 1.) die Bindungseigenschaften von HDAC3 an RRE enthaltende Promotoren verändert, 2.) die Deacetylase-Aktivität beeinträchtigt und somit zu veränderten Chromatinstrukturen führt, oder 3.) die Bindung von Co-Repressoren (REV-ERB $\alpha$ , N-CoR1) reduziert. In jedem dieser sich gegenseitig nicht ausschließenden Szenarios

würde die Funktion des Repressorkomplexes eingeschränkt sein. Dies würde entsprechend der formulierten Hypothese 1 zu einer verstärkten *Bmal1*-Transkription führen.

Um zu testen, ob HDAC3 nach Depletion von *Pp4c* 1.) noch in der Lage ist an den *Bmal1*-Promotor zu binden, und 2.) deren Deacetylierungsaktivität beeinflusst ist, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt. Humane U-2 OS Zellen wurden lentiviral entweder mit einer Kontroll-shRNA oder einer shRNA gegen *Pp4c* transduziert. Selektionierte Zellen wurden dann mit Dexamethason synchronisiert und in 4 h-Intervallen über einen Zeitraum von 24 h geerntet und lysiert. Chromatin-Immunpräzipitationen wurden entweder mit  $\alpha$ -HDAC3 oder  $\alpha$ -Lys3K9Ac Antikörper, durch den sich der Acetylierungsgrad eines funktional relevanten Lysinrestes an Histon 9 feststellen lässt, an Protein-A gekoppelten Agarose-Beads durchgeführt (siehe Abb. 3.11). Anschließend dienten spezifische Primer um das RRE-Element im *Bmal1*-Promotor zum Nachweis der Protein/DNA-Bindung bzw. des Acetylierungsgrades mittels RT-qPCR.

Das Bindungsprofil von HDAC3 in den Kontrollzellen zeigte eine deutliche Oszillation, mit der maximalen Bindung bei 28 h und der minimalen Bindung bei 40 h nach Synchronisation (siehe Abb. 3.11A). Im HDAC3-Bindungsverhalten der *Pp4c* depletierten Zellen zeigte sich ebenso eine deutliche Oszillation, interessanterweise wies diese Rhythmik allerdings eine verfrühte Phase auf. So war der Zeitpunkt der minimalen HDAC3-Bindung bei etwa 36 h nach Synchronisation und damit ca. 4 h früher als in den Kontrollzellen erreicht. Dies könnte auf eine kürzere circadiane Periode hinweisen, wie sie ebenso in der Luciferase-Aktivitätsmessung in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen zu sehen war (siehe Kapitel 3.2.1). Aufgrund der Dauer des Experimentes kann dies aber nicht eindeutig geklärt werden. Desweiteren korrelierten beide Bindungsmuster mit der jeweiligen circadianen Oszillation der *Bmal1* mRNA-Expression. Zu Zeiten, wenn die Bindung von HDAC3 – und damit die repressorische Aktivität – am höchsten ist, sind die *Bmal1* mRNA Level am niedrigsten und umgekehrt.

Weiterhin wurde als Maß für die HDAC3-Aktivität ebenfalls im Promotor von *Bmal1* der Acetylierungsgrad des Chromatins analysiert (siehe Abb. 3.11B). Eine durch *Pp4c*-Depletion erhöhte HDAC3-Aktivität würde sich in einer gesteigerten Deacetylierung äußern, was mit transkriptionsinaktivem Chromatin korreliert und damit eine verringerte Promotoraktivität bewirkt. In den Kontrollzellen zeigte sich ein rhythmisches Acetylierungsmuster von Lysin 3



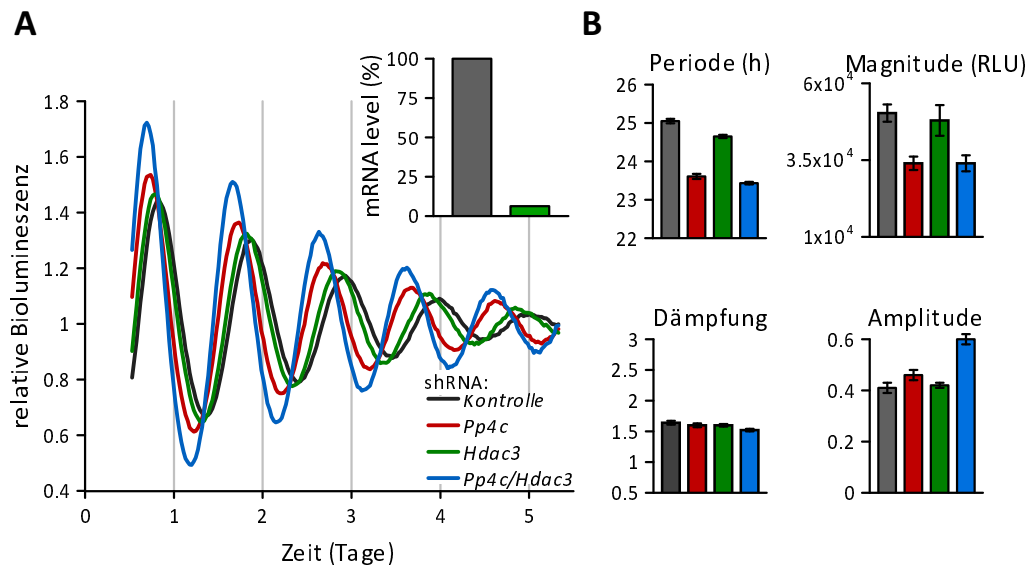
**Abb. 3.11: Genetische Depletion von *Pp4c* beeinflusst die Bindung und Aktivität von HDAC3 an RRE-Elementen im Promotor von *Bmal1*.**

Humane U-2 OS Zellen wurden lentiviral entweder mit einer Kontroll-shRNA (schwarze Balken) oder einer shRNA gegen *Pp4c* (graue Balken) transduziert. Selektionierte Zellen wurden ausgesät und 24 h nach Dexamethason-Synchronisation in 4 h-Intervallen über einen Zeitraum von 24 h geerntet und lysiert. Chromatin-Immunpräzipitationen wurden von Dr. Roman Klemz und Violeta Castelo Székely entweder mit  $\alpha$ -HDAC3 (**A**) oder  $\alpha$ -Lys3K9Ac Antikörper (**B**) an Protein-A gekoppelten Agarose-Beads durchgeführt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der spezifisch präzipitierten DNA-Sequenz (RRE *Bmal1*) relativ zum Input (nicht präzipitierte DNA). Die Fehlerbalken repräsentieren den Bereich von zwei unabhängigen Chromatin-Immunpräzipitationen eines biologischen Replikates. Zur Veranschaulichung ist die Dynamik der *Bmal1* mRNA dargestellt (siehe auch Abb. 3.7).

an Histon 9, das anti-phasisch zur HDAC3-Bindung oszillierte. Dies unterstützt die Annahme, dass ein geringer Acetylierungsgrad und damit ein transkriptionsinaktives Chromatin, mit erhöhter HDAC3-Bindung und somit verminderter *Bmal1*-Expression einhergeht. In den *Pp4c* depletierten Zellen konnte dagegen, entsprechend der HDAC3-Bindung, ein verändertes Acetylierungsprofil beobachtet werden, mit der maximalen Acetylierung zwischen den Zeitpunkten 32-36 h, also ca. 4 h früher als in der Kontrolle. Hier spiegelt sich wiederum die durch *Pp4c* mRNA-Depletion induzierte kurze Periode und damit frühere Phase der circadianen Oszillation wider.

#### PP4C-AKTIVITÄT IST NICHT ABHÄNGIG VON HDAC3

Die vorherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass PP4c über HDAC3 direkt auf die *Bmal1*-Promotoraktivität wirken könnte (Hypothese 1, siehe Kapitel 3.3.2). Erstens führte die Reduktion der PP4c-Aktivität zu einer verringerten *Bmal1*-Transkription in oszillierenden Zellen. Unterstützend dazu konnte in einem von der circadianen Uhr entkoppelten System gezeigt werden, dass im Umkehrschluss die Überexpression von *Pp4c* zu einer



**Abb. 3.12: Die durch *Pp4c* mRNA-Depletion induzierte kurze Periode wird nicht über die HDAC3-Aktivität vermittelt.**

(A) Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Zellen bei genetischer Depletion von *Pp4c* (rot), *Hdac3* (grün) bzw. *Pp4c* und *Hdac3* (blau). Die Effizienz der *Hdac3* mRNA-Depletion wurde von einem Replikat mittels RT-qPCR analysiert und relativ zur Kontroll-shRNA dargestellt. (B) Auswertung der Parameter Periode, Magnitude, Dämpfung und Amplitude. Die Farbkodierung der Balken bezieht sich auf die entsprechenden Ansätze in A.

(A und B) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von vier unabhängigen Replikaten eines Experimentes.

Transkriptionsaktivierung vom RRE-Element im *Bmal1*-Promotor führte. Zweitens zeigte sich in Zellen, in denen die PP4c-Aktivität durch mRNA-Depletion reduziert ist, eine veränderte HDAC3-Bindung und -Aktivität. Wenn ein regulativer PP4c Effekt auf die *Bmal1*-Promotoraktivität tatsächlich über die HDAC3-Aktivität vermittelt wird, sollte die *Pp4c*-Depletion bei gleichzeitiger Hemmung von HDAC3 keine kurze Periode verursachen.

Um dies zu testen, wurde in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen mittels RNAi Technologie simultan sowohl *Hdac3* als auch *Pp4c* mRNA depletiert. Obwohl die *Hdac3* Genexpression sehr effizient um ca. 95 % reduziert werden konnte und dies zu einer leichten Periodenverkürzung von ca. 0,5 h führte, hatte die *Hdac3*-Depletion keinen Einfluss auf die durch *Pp4c* mRNA-Depletion verkürzte Periode der Oszillation (siehe Abb. 3.12). Zwar konnten in den bisherigen Experimenten einige Anhaltspunkte dafür gesammelt werden, dass PP4c innerhalb der positiven Rückkopplung über den repressorischen Komplex direkt induzierend auf den *Bmal1*-Promotor wirkt, jedoch scheint zumindest ein funktionales Zusammenspiel von PP4c und HDAC3 nicht ausschließlich für den veränderten circadianen

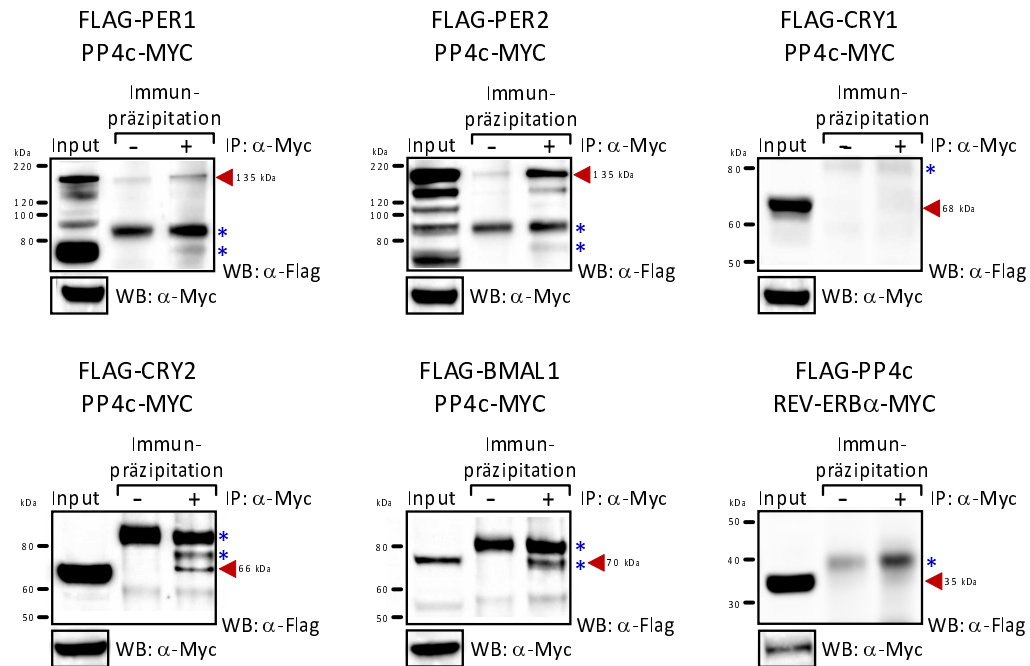
Phänotyp verantwortlich zu sein. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die noch verbleibende *Hdac3*-Gendosis und damit Restaktivität immer noch hinreichend ist, um eine potentielle Funktion von PP4c zu vermitteln.

### 3.3.4 PP4C INTERAGIERT MIT ESSENTIELLEN UHRPROTEINEN

Bisher wurde basierend auf der in Kapitel 3.3.2 formulierten Hypothese 1 eine potentielle regulatorische Funktion von PP4c auf den *Bmal1*-Promotor untersucht (siehe Kapitel 3.3.3). Da allerdings eine ektopische Überexpression von *Pp4c* ebenfalls in einer drastischen Repression der Amplituden und Magnituden von E-Box kontrollierten Genen resultierte, könnte PP4c zusätzlich entsprechend Hypothese 2 auch direkt auf die E-Box getriebene Uhrenexpression inhibierend wirken (siehe Kapitel 3.3.2). So könnte PP4c innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife auf den inhibitorischen Komplex verstärkend einwirken. Spezifische Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen an Uhrproteinen können dabei diverse Auswirkungen auf deren räumlich-zeitliche Funktion haben, wie zum Beispiel die Modulation der Proteinstabilität, die subzelluläre Lokalisation, die Komplexbildung oder die Aktivität. Für solche Regulationen wäre allerdings die Interaktion zwischen PP4c und Uhrproteinen eine Voraussetzung, weshalb mittels Co-Immunpräzipitationen nach potentiellen Interaktionspartnern gesucht wurde (siehe Abb. 3.13).

Dazu wurden in HEK 293 Zellen die essentiellen Uhrproteine mit einem N-terminalen Flag-Tag jeweils mit PP4c-Myc ektopisch überexprimiert (mit Ausnahme von REV-ERB $\alpha$ , das in der anderen Konfiguration verwendet wurde). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und Proteinlysate hergestellt, die für die IP mit  $\alpha$ -Myc Antikörper und Protein-G gekoppelten Agarose Beads eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle diente eine Immunpräzipitation ohne  $\alpha$ -Myc Antikörper. Die Präzipitate wurden im Westernblot mit  $\alpha$ -Flag Antikörper analysiert.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich PP4c und die inhibitorischen Uhrkomponenten PER1, PER2 und CRY2 in einem Komplex befinden, was auf eine regulatorische Funktion von PP4c im negativen Rückkopplungsmechanismus der circadianen Uhr schließen lässt. Eine Interaktion mit BMAL1 konnte nicht ausgeschlossen werden, da die eigentliche Migrationsbande (bei 70 kDa) vermutlich von einer unspezifischen Bande überlagert wurde.



**Abb. 3.13: PP4c interagiert mit den inhibitorischen circadianen Uhrproteinen PER1, PER2 und CRY2.**

Uhrproteine mit einem N-terminalen Flag-Tag wurden jeweils mit PP4c-Myc in HEK 293 ektopisch exprimiert (Ausnahme REV-ERB $\alpha$ -Myc und Flag-PP4c). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und Proteinlysate hergestellt, die für die Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -Myc Antikörper und Protein-G gekoppelten Agarose Beads eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle diente eine Immunpräzipitation ohne  $\alpha$ -Myc Antikörper. Die Präzipitate wurden im Westernblot mit  $\alpha$ -Flag Antikörper analysiert. Die roten Pfeile markieren die Migrationsbande der untersuchten Proteine. Die blauen Sterne markieren unspezifische Banden. Zusätzlich wurden für jeden Ansatz Input-Kontrollen mitgeführt und im Westernblot mit  $\alpha$ -Flag bzw.  $\alpha$ -Myc Antikörper analysiert, um die Überexpression der entsprechenden Proteine zu bestätigen.

### 3.3.5 PP4C HAT KEINE FUNKTIONELLE RELEVANZ FÜR DIE STABILITÄT VON UHRPROTEINEN

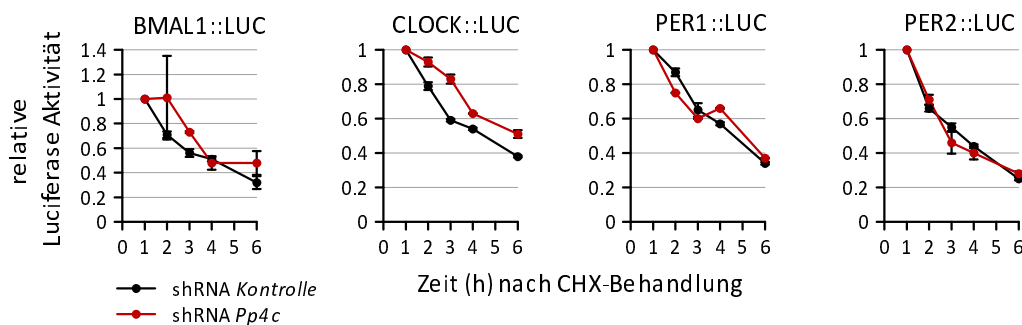
Uhrproteine unterliegen innerhalb der verzögerten negativen Rückkopplung im circadianen Uhrmechanismus funktionell relevanten Phosphorylierungsprozessen durch Kinasen, die z. B. zu einer Veränderung der Proteinstabilität führen kann. Für mPER2 beispielsweise wurde in den vergangenen Jahren demonstriert, dass – in Abhängigkeit von spezifischen Phosphorylierungen im PER2 Protein – die Stabilität maßgeblich beeinflusst ist und eine Beeinträchtigung dieser Phosphorylierungen erhebliche Auswirkungen auf die präzise zeitliche und räumliche Regulation innerhalb der negativen Rückkopplung hat, resultierend in einer veränderten circadianen Oszillationsdynamik (siehe Kapitel 1.6). Basierend auf den vorherigen Interaktionsstudien, die eine Komplexbildung von PP4c mit inhibitorischen



Uhrkomponenten demonstrieren, besteht die Möglichkeit, dass die Aktivität von PP4c über die spezifische Bindung und Dephosphorylierung von diesen Proteinen deren Stabilität reguliert.

Zur Untersuchung eines Einflusses von PP4c auf die Proteinstabilität, wurde eine Methode benutzt, die es erlaubt mittels Biolumineszenz eines Luciferase-Fusionsproteins die Halblebenszeit der zu untersuchenden Proteine auszulesen. Dazu wurden U-2 OS Zellen, die stabil die Fusionsproteine BMAL1::LUC, CLOCK::LUC, PER1::LUC oder PER2::LUC exprimieren, entweder mit einer Kontroll-shRNA oder eine shRNA gegen *Pp4c* transduziert (siehe Abb. 3.14). Die Fusionsproteine CRY1::LUC und CRY2::LUC konnten aufgrund einer zu geringen Luciferase-Aktivität nicht gemessen werden. Selektionierte Zellen wurden ausgesät und zur Inhibition der *de novo*-Synthese von Proteinen mit dem Reagenz Cycloheximid (CHX) behandelt. Anhand der Abnahme der Luciferase-Aktivität nach CHX-Zugabe, als Konsequenz des proteasomalen Abbaus, konnte die Halblebenszeit analysiert werden.

Eine reduzierte PP4c-Aktivität zeigte keine Auswirkung auf die Halblebenszeit der untersuchten Proteine. Das deutet darauf hin, dass die PP4c-Aktivität keine Wirkung auf die Stabilität dieser Proteine hat. Allerdings können mögliche Effekte von PP4c auf die Stabilität von Uhrproteinen nicht unmittelbar ausgeschlossen werden, wenn man



**Abb. 3.14: PP4c hat keine deutlich messbare Wirkung auf die Stabilität von essentiellen Uhrproteinen.**

Humane U-2 OS Zellen, die stabil BMAL1::LUC, CLOCK::LUC, PER1::LUC oder PER2::LUC exprimieren, wurden entweder mit einer Kontroll-shRNA oder eine shRNA gegen *Pp4c* transduziert. Selektionierte Zellen wurden ausgesät und 5 Tage nach Aussaat zur Inhibition der *de novo*-Proteinsynthese mit Cycloheximid behandelt. Darauf folgend wurde die Abnahme der Luciferase-Aktivität als Maß für die Proteinabundanz in einstündigen Intervallen über einen Zeitraum von 6 h gemessen. Dargestellt ist die Luciferase-Aktivität der *Pp4c* depletierten Zellen (rot) und Kontrollzellen (schwarz) relativ zum jeweiligen Messwert 1 h nach CHX-Zugabe. Fehlerbalken pro Zeitpunkt repräsentieren den Bereich von zwei unabhängigen Replikaten eines Experimentes.

berücksichtigt, dass zu jedem gemessenen Zeitpunkt der gesamte Pool an Proteinmolekülen in nicht-synchronisierten Zellen analysiert wird. Das bedeutet, dass sich jedes Molekül in einem anderen funktionalen Phosphorylierungszustand befinden könnte. Wenn PP4c dabei nur auf einen geringen Prozentsatz regulativ wirken kann, könnten potentielle Effekte maskiert werden.

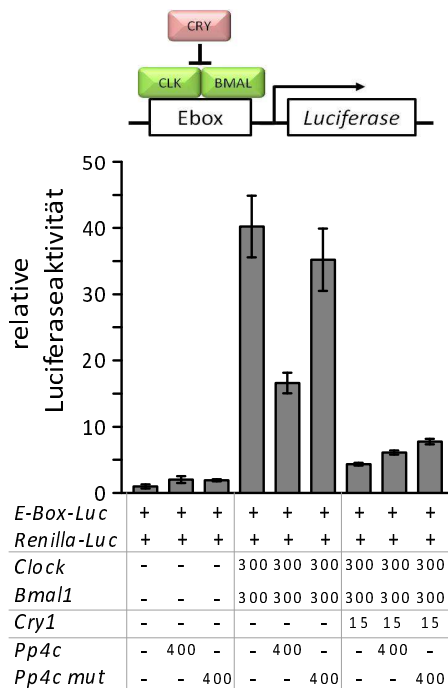
#### 3.3.6 DIE CLOCK/BMAL1-VERMITTELTE E-BOX TRANSAKTIVIERUNG WIRD DURCH PP4C INHIBIERT

Zwar konnte bisher eine Interaktion zwischen PP4c und den inhibitorischen Uhrkomponenten PER1, PER2 und CRY2 identifiziert werden, was eine funktionelle Rolle von PP4c innerhalb des negativen Rückkopplungsmechanismus und damit Hypothese 2 bekräftigt, allerdings gab es unter den durchgeführten Versuchsbedingungen keine Hinweise für eine regulatorische Funktion im Hinblick auf die Stabilität. Ein alternativer Mechanismus ist vorstellbar, der die durch ektopische Überexpression von *Pp4c* induzierten drastischen Amplituden- und Magnitudenreduktion von E-Box getriebenen Uhrgenen erklären würde: PP4c reguliert direkt die Uhrgenexpression durch Inhibition des CLOCK/BMAL1-Transaktivatorkomplexes.

Um zu testen, ob PP4c einen direkten Einfluss auf die CLOCK/BMAL1-vermittelte E-Box getriebene Transkription hat, wurde ein statisches, von der circadianen Uhr entkoppeltes, Luciferase-Reporter-Modell in HEK 293 Zellen verwendet, das es erlaubt, die durch CLOCK/BMAL1 induzierte transkriptionelle Aktivität eines artifiziellen E-Box Promotorfragments über die Luciferase-Aktivität auszulesen.

Dazu wurden HEK 293 Zellen transient mit dem Reportergen-Konstrukt *E-Box-Luciferase* und als Transfektionskontrolle *Renilla-Luciferase* transfiziert. Zusätzlich wurden in den verschiedenen kombinierten Ansätzen die Transaktivatoren *Clock* und *Bmal1*, der Repressor *Cry1*, sowie wildtypische *Pp4c* und die dominant-negative *Pp4c* Mutante, co-exprimiert (siehe Abb. 3.15). Nach 48 h in Kultur wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Aktivität in einem Luminometer gemessen. Dabei wurde für jeden Ansatz die Luciferase-Aktivität des E-Box-Reporters auf die entsprechende Renilla-Luciferase-Aktivität normalisiert, um technische Fehler zu minimieren.

Die Überexpression von *Clock/Bmal1* zeigte gegenüber der basalen Promotoraktivität



**Abb. 3.15: Überexpression von *Pp4c* moduliert die CLOCK/BMAL1-vermittelte Transaktivierung von E-Boxen.** HEK 293 Zellen wurden mit den Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukten *E-Box-Luc* (50 ng) und *Renilla-Luc* (2 ng) (jeweils mit + gekennzeichnet) transfiziert. Die entsprechenden Expressionsvektoren wurden in den angegebenen Mengen (ng/Ansatz) co-transfiziert, – bedeutet keine Expression. Nach der Lysis der Zellen wurde die Luciferase-Aktivität über das Dual-Luciferase-Assay-System (Promega) bestimmt. Dargestellt sind die Luciferase-Aktivitäten in den einzelnen Ansätzen relativ zur Luciferase-Aktivität des Kontrollansatzes (nur Luciferase-Reporter-Konstrukte). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes. Das Experiment wurde insgesamt dreimal unabhängig voneinander mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

eine ca. 40-fache Induktion der Luciferase-Aktivität, was eine erfolgreiche Transaktivierung anzeigt. Durch die zusätzliche Expression von *Cry1*, welches innerhalb des circadianen Uhrmechanismus als starker Repressor des CLOCK/BMAL-Transaktivator-Komplexes gilt, konnte dieser Effekt wieder um ca. 8-fach revertiert werden. Interessanterweise zeigte sich bei Überexpression von *Pp4c* eine deutliche, ca. 2-fache Reduktion der durch CLOCK/BMAL1 induzierten Luciferase-Aktivität, während die dominant-negative *Pp4c* Mutante keine Auswirkungen hatte. Dies konnte in drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden und es konnte ausgeschlossen werden, dass *Pp4c* auch keinen Einfluss auf die Luciferase-Aktivität hat. Auf die repressorische Aktivität von CRY1 hatten weder wildtypische *Pp4c*, noch die dominant-negative Mutante einen signifikanten Effekt.

Insgesamt unterstützen die Ergebnisse die Annahme, dass eine gesteigerte PP4c-Aktivität auf die CLOCK/BMAL1 vermittelte E-Box getriebene Transkription inhibierend wirkt.

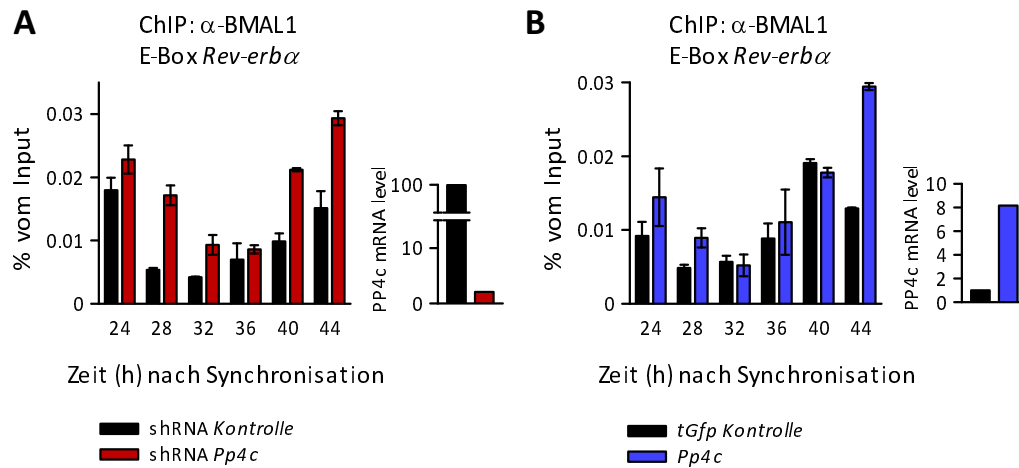
### 3.3.7 DIE BINDUNG VON BMAL1 AN E-BOXEN IST ABHÄNGIG VON DER *Pp4c* GENDOSIS

Die vorherigen Untersuchungen in einem statischen Luciferase-basierten Reportermodell in HEK 293 Zellen deuten auf eine PP4c-abhängige Repression der CLOCK/BMAL1 in-

duzierten transkriptionellen Aktivität eines artifiziellen E-Box Promotorfragmentes hin. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den in der circadianen Genexpressionsanalyse gefundenen erheblichen Magnitudenreduktionen von E-Box getriebenen Genen (siehe Kapitel 3.3.1). Deswegen sollte als nächstes geklärt werden, durch welchen Mechanismus PP4c die CLOCK/BMAL1 vermittelte E-Box getriebene Transkription inhibieren könnte. Es ist bereits in einigen Studien gezeigt worden, dass Kinase-induzierte Phosphorylierungen an spezifischen Aminosäuren von CLOCK oder BMAL1 die transkriptionelle Aktivität durch Modulation der Proteinstabilität, der subzellulären Lokalisation oder deren Bindung an die DNA regulieren können (siehe Kapitel 1.6.1). Ebenso sind Hinweise in der Literatur zu finden, die Phosphatasen eine wichtige regulatorische Funktion zuschreiben: So wurde beispielsweise kürzlich in der circadianen Uhr von Säugetieren eine zeitabhängige Modulation der CLOCK/BMAL1-Funktion durch PP1 demonstriert, die sich in einer negativen Regulation der Transaktivierung und beschleunigten BMAL1-Degradation äußert. Desweiteren spielt PP4c in der circadianen Oszillationsdynamik von *Neurospora* eine entscheidende Rolle, in dem es die nukleäre Akkumulation und die Bindung der positiven Transkriptionsfaktoren WCC an die DNA begünstigt (siehe Kapitel 1.6.2).

Um zu untersuchen, ob die circadiane Bindung von BMAL1 an E-Boxen in oszillierenden Zellen in Abhängigkeit von einer veränderten *Pp4c* Gendosis reguliert wird, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden in humanen U-2 OS Zellen mittels lentiviraler Transduktion entweder *Pp4c* auf mRNA Ebene durch Verwendung einer spezifischen shRNA gegen die katalytische Untereinheit depletiert oder ektopisch überexprimiert. Als Kontrolle fungierte dabei jeweils die Expression einer nicht-gerichteten Kontroll-shRNA bzw. die Überexpression von *tGfp*. Selektionierte Zellen wurden ausgesät und 24 h nach Dexamethason-Synchronisation in 4 h-Intervallen über einen Zeitraum von 24 h geerntet und lysiert. Für jeden circadianen Zeitpunkt wurden Chromatin-Immunpräzipitationen mit  $\alpha$ -BMAL1 Antikörper und Protein-A gekoppelten Agarose-Beads durchgeführt. Anschließend wurde die Anreicherung eines E-Box enthaltenden Promotorfragments von *Rev-Erb $\alpha$*  als Nachweis zur Bindung herangezogen (siehe Abb. 3.16).

In den shRNA- bzw. *tGfp*-Kontrollen zeigte sich eine deutliche Oszillation im Bindungsprofil von BMAL1, mit der minimalen Bindung bei etwa 28-32 h nach Synchronisation. Dieses Bindungsmuster korrelierte mit der circadianen Oszillation der *Rev-Erb $\alpha$*  mRNA-Expression



**Abb. 3.16: Die Gendosis von *Pp4c* beeinflusst die Bindung von BMAL1 an E-Boxen in den Promotoren von Uhrgenen.**

In humanen U-2 OS Zellen wurde mittels lentiviraler Transduktion entweder *Pp4c* auf mRNA Ebene durch Verwendung einer spezifischen shRNA gegen die katalytische Untereinheit spezifisch depletiert (rote Balken) (**A**) oder ektopisch überexprimiert (blaue Balken) (**B**). Als Kontrollen fungierten dabei die Expression einer Kontroll-shRNA bzw. *tGfp* (jeweils schwarze Balken). Selektionierte Zellen wurden ausgesät und 24 h nach Dexamethason-Synchronisation in 4 h-Intervallen über einen Zeitraum von 24 h geerntet und lysiert. Chromatin-Immunpräzipitationen wurden von Dr. Roman Klemz mit  $\alpha$ -BMAL1 Antikörper und Protein-A gekoppelten Agarose-Beads durchgeführt. Spezifische Primer für die E-Box im *Rev-Erb $\alpha$* -Promotor dienten zum Nachweis der Protein/DNA-Bindung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der spezifisch präzipitierten DNA-Sequenz (E-Box *Rev-Erb $\alpha$* ) relativ zum Input (nicht präzipitierte DNA). Die Fehlerbalken repräsentieren den Bereich von zwei unabhängigen Chromatin-Immunpräzipitationen eines biologischen Replikates. Die effiziente Depletion bzw. Überexpression von *Pp4c* wurde im gleichen Experiment von einem kleinen Anteil der transduzierten Zellen mittels RT-qPCR analysiert. Die Quantifizierung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durch Normalisierung auf *Gapdh* und relativ zum Expressionslevel der jeweiligen Kontrollzellen.

(vgl. Kapitel 3.3.1). Zu Zeiten, wenn die BMAL1-Bindung – und damit Transaktivierung – am höchsten ist, ist auch die *Rev-Erb $\alpha$*  mRNA-Expression am höchsten und umgekehrt.

Bei Reduktion der PP4c-Aktivität durch mRNA-Depletion waren die Bindungseigenschaften von BMAL1 deutlich verändert. Zwar zeigte die BMAL1-Bindung ebenso wie in der Kontrolle eine eindeutige Oszillation, interessanterweise wies diese Rhythmik allerdings eine veränderte Phase auf, wie sie ebenfalls in der Luciferase-basierten Messung der Oszillationsdynamik zu sehen war. Desweiteren führte insgesamt die verminderte PP4c-Aktivität zu einer vermehrten BMAL1-Bindung an die DNA. Überraschenderweise zeigte sich in der Überexpression von *Pp4c* ebenso eine verstärkte BMAL1-Bindung, die sogar mit einer höheren Amplitude im Vergleich zu den Kontrollzellen oszillierte. Beide Datensätze stehen offensichtlich in Diskrepanz zueinander, da sowohl eine verminderte, als auch eine erhöhte *Pp4c* Gendosis die Bindung an die E-Box im *Rev-Erb $\alpha$* -Promotor fördert.

Wie diese Ergebnisse in einen funktionellen Zusammenhang gebracht werden können, wird im Detail in der Diskussion beschrieben. Unter Berücksichtigung aller in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, wurde dabei abschließend ein hypothetisches Modell bezüglich einer regulativen Wirkungsweise von PP4c im circadianen Uhrmechanismus von Säugetieren entwickelt und erörtert (siehe Kapitel 4.2.3).

## 4 DISKUSSION

Die Dynamik der circadianen Uhr in Säugern wird durch diverse molekulare Prozesse reguliert, wobei posttranslationale Modifikationen und insbesondere die Phosphorylierung von Uhrproteinen ein bedeutender Mechanismus ist. Phosphorylierungen sind für viele intrazelluläre Regulationsprozesse von Bedeutung. Dabei wird häufig ein fein justiertes Gleichgewicht von phosphorylierter und dephosphorylierter Form eines Proteins – ähnlich einem Schalter – in die ein oder andere Richtung verschoben, um einen Folgeprozess zu steuern. Ein solches Gleichgewicht wird in der Regel durch die Aktivität von Kinasen und Phosphatasen hergestellt. Im Mechanismus der circadianen Uhr in Säugern lag der Fokus bisheriger Untersuchungen auf der Aufklärung der Funktionsweise von Kinasen. Ob und welche Phosphatasen an der Feinjustierung von Prozessen der molekularen circadianen Uhr beteiligt sind, wurde bisher nur unzureichend analysiert. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob und wie Phosphatasen im Säuger für die Modulation der circadianen Oszillationsdynamik eine Rolle spielen.

Durch ein systematisches Screening, bei dem die mRNA einzelner Serin/Threonin-Phosphatasen der PPP-Familie durch RNAi-Technologie gezielt depletiert wurde, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Phosphatasen einen substanziellen Einfluss auf die circadiane Oszillationsdynamik haben. Generell zeigte sich bei Depletion aller untersuchten Phosphatasen eine starke Reduktion der Amplitude der circadianen Oszillation. Diese Beobachtungen deuten einerseits auf einen globalen und bedeutsamen direkten Mechanismus im molekularen Uhrwerk hin, könnten andererseits aber auch indirekte Ursachen haben, beispielsweise indem Phosphatasen auf essentielle zelluläre Prozesse wirken, die ihrerseits die circadiane Oszillationsdynamik beeinflussen.

Als Resultat des systematischen RNA-Screenings wurden interessante Phosphatasen für weitere Analysen ausgewählt (PP1, PP2A, PP4c), deren funktionelle Rolle für den

circadianen Oszillator näher untersucht werden sollte. Insbesondere PP4c ließ auf einen interessanten Mechanismus schließen, da die RNAi vermittelte mRNA-Depletion zu einer signifikant kurzen Perioden führte, die nach Perturbation des circadianen Uhrwerks nur relativ selten auftritt. Daraufhin sollten Anhaltspunkte für einen molekularen Wirkungsmechanismus von PP4c gefunden werden. Zur Aufklärung der Funktion wurde dabei zunächst weiter untersucht, wie eine veränderte *Pp4c* Gendosis die Oszillationsdynamik beeinflusst. Dabei konnten hauptsächlich folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

1. Eine reduzierte PP4c-Aktivität durch RNAi vermittelte mRNA-Depletion führte zu einer kurzen Periode der circadianen Oszillation, die sowohl spezie- als auch gewebeübergreifend auftrat.
2. Eine erhöhte PP4c-Aktivität durch ektopische Überexpression von *Pp4c* zeigte eine starke Amplitudenreduktion der Oszillation.
3. Dagegen führte die Überexpression einer dominant-negativen Mutante, die keine PP4c-Aktivität aufweist, zu einer kurzen Periode und imitierte damit den Phänotyp der spezifischen mRNA-Depletion von *Pp4c*.
4. Durch ektopische Überexpression von wildtypischer *Pp4c* (nicht aber der dominant-negativen Mutante) konnte der kurze Perioden-Phänotyp der *Pp4c*-Depletion revertiert werden.

Anschließend lieferten weiterführende mechanistische Untersuchungen erste Erkenntnisse über eine mögliche funktionelle Rolle von PP4c innerhalb des circadianen Oszillators:

1. Eine veränderte Gendosis von *Pp4c* führte zu veränderten circadianen Expressionsprofilen von relevanten Uhrgenen.
2. Aus den veränderten Genexpressionsmustern ließen sich zwei Arbeitsmodelle ableiten, die auf eine duale Rolle von PP4c schließen lassen: Einerseits könnte PP4c innerhalb der positiven Rückkopplungsschleife in die direkte Regulation der *Bmal1*-Transkription über Modulation des RRE-Elementes im *Bmal1*-Promotor involviert sein. Andererseits könnte PP4c innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife die



BMAL1-Bindung an die DNA modulieren und somit E-Box getriebene Gene regulieren.

## 4.1 DIE BEDEUTUNG VON PHOSPHATASEN FÜR DIE CIRCADIANE UHR VON SÄUGERN

### 4.1.1 DIE RELEVANZ VON PHOSPHATASEN

In den letzten Jahren gab es vermehrt Untersuchungen bezüglich Phosphorylierungsreaktionen an essentiellen Uhrproteinen durch Kinasen. Insbesondere Casein Kinase 1 $\epsilon/\delta$  und Casein Kinase 2 konnten in verschiedenen Modellorganismen als geschwindigkeitsbestimmende Schlüsselenzyme innerhalb des negativen Rückkopplungsmechanismus identifiziert werden [Reischl und Kramer, 2011]. Über eine Rolle von Phosphatasen in der Säugetieruhr ist hingegen, im Vergleich zu niedrigeren Organismen wie in *Drosophila* und *Neurospora*, wenig bekannt. Zum Einen könnte dies an der enormen strukturellen und funktionellen Komplexität an Phosphatasen im Säuger liegen, die spezifische Untersuchungen erschweren: Im Vergleich zu der großen Anzahl an spezifischen Kinasen im humanen Genom, gibt es zwar nur sehr wenig katalytische Untereinheiten der Phosphatasen. Die Aktivität und Spezifität wird aber vor allem über die Assoziation mit regulatorischen Untereinheiten gesteuert. Alle Untereinheiten, die ein individuelles funktionales Holoenzym bilden, können je nach Bedarf der Zelle ausgetauscht werden und unterschiedliche zelluläre Funktionen vermitteln. Zudem wird die Komplexität und Anzahl von potentiellen Holoenzymen zusätzlich erhöht, da zum Teil mehrere Isoformen und Splicing-Varianten einer Untereinheit existieren, deren Aktivität und gewebespezifische Expression variieren. Zum Anderen stellt sich grundsätzlich die Frage, ob Dephosphorylierungsreaktionen an Uhrproteinen durch Phosphatasen eine ebenso wichtige Rolle spielen wie Phosphorylierungen durch Kinasen. Es wäre z. B. vorstellbar, dass ein spezifisches Phosphorylierungsereignis an einem Protein, etwa PER2, zu einem definierten Zeitpunkt auftritt und damit dem Protein eine tageszeitspezifische Funktion verleiht. Anschließend könnte das Protein dem proteasomalen Abbau unterliegen; dann wäre eine Dephosphorylierung nicht unbedingt notwendig. Dagegen spricht, dass bisher auch stabilisierende Phosphorylierungen auf Uhrproteinen

gefunden wurden [Maier et al., 2009; Vanselow et al., 2006] und eine Phosphorylierung neben der Regulation der Proteinstabilität auch andere wichtige Prozesse wie beispielsweise die subzelluläre Lokalisation, Komplexbildung oder Aktivität von Proteinen regulieren [Gallego und Virshup, 2007]. Zudem kann die Aktivität von Kinasen selbst durch reversible Phosphorylierung kontrolliert werden. Vermutlich spielt Dephosphorylierung in der molekularen Säugeruhr eine weitaus zentralere Rolle als bisher angenommen, vor allem unter dem Aspekt, dass ein Schalter zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung eine schnelle Anpassungsfähigkeit an sich verändernde exogene Bedingungen erlaubt. Proteinaktivitäten und Signaltransduktionsketten innerhalb der molekularen Uhr könnten somit schnell und präzise reguliert werden, ohne dass die Zelle eine energieaufwendige Neusynthese von Proteinen betreiben muss. Die spezifische Aktivität von Phosphatasen könnte ein weiteres, fundamentales Zahnrad für die posttranslationalen Feinjustierung der inneren Uhr von Säugern darstellen und damit für eine robuste Oszillationsdynamik relevant sein.

### 4.1.2 *loss-of-function* SCREENING NACH VERÄNDERTEN CIRCADIENEN PHÄNOTYPEN

Um zu untersuchen, inwiefern die Aktivität von humanen Ser/Thr-Phosphatasen für die Generierung von molekularen circadianen Rhythmen in der Säugetieruhr eine Rolle spielt, wurde ein RNAi basiertes *loss-of-function*-Screening bezüglich veränderter circadianer Phänotypen durchgeführt. Dabei wurde in Echtzeitmessung die circadiane Oszillationsdynamik von lebenden Zellen über eine *Bmal1*-Promotor getriebene Luciferase-Aktivität ausgelesen. Grundlage dieser *state-of-the-art* Technologie im Feld der Chronobiologie ist die effiziente mRNA-Depletion der zu untersuchenden Gene mittels lentiviraler Transduktion von shRNA-Konstrukten und das gleichzeitige Auslesen der endogenen circadianen Uhr in lebenden Zellen. Gegenüber siRNA-Screenings bietet die Verwendung von shRNAs den Vorteil, dass eine stabile Integration in transkriptionsaktive Bereiche des Genoms gewährleistet und somit eine langfristige Expression garantiert wird. Auch gegenüber der Anwendung pharmakologischer Substanzen bietet dieser Ansatz einen Vorteil, da Phosphatase-Inhibitoren in der Regel aufgrund ausgeprägter Sequenzhomologien der katalytischen Zentren unspezifisch agieren, und die Effekte stark von der inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) abhängig sind.

Die Periodenanalyse des RNAi-Screenings ergab eine deutlich verkürzte Periode bei

mRNA-Depletion von *Pp4c* (siehe Abb. 3.1). Die Depletion der katalytischen Untereinheiten von anderen Ser/Thr-Phosphatasen zeigten entweder gar keinen circadianen Phänotyp oder nur leichte Trends zu verlängerten Perioden, wie z. B. bei Depletion von *Pp1cb*, *Pp1cc* und *Pp2cb*. Aufgrund der Durchführung des Screenings im Mikrotiterplattenformat ist eine technische Limitation, dass es keine Möglichkeit zur Bestimmung der Effizienz der mRNA-Depletionen gab und daher die Funktionalität der shRNAs nicht überprüft werden konnte. Denkbar wäre daher, dass entweder shRNA-Konstrukte nicht die korrekte Sequenz besitzen oder einzelne katalytische Untereinheiten der Phosphatasen nicht in U-2 OS Zellen exprimiert werden. Unabhängig von den technischen Einschränkungen könnte ein circadianer Phänotyp auch „maskiert“ sein, da für die katalytischen Untereinheiten von Pp1, Pp2, Pp3 und Pp7 mehrere Isoformen existieren, die funktional redundant sein, oder sich gegenseitig kompensieren könnten.

Um redundante Funktionen von Isoformen auszuschließen, wurde ein zweites Screening in einem größeren Zellkultur-Maßstab durchgeführt, bei dem im Vorfeld auch die Effizienz der mRNA-Depletion und Spezifität der verwendeten shRNA-Konstrukte getestet wurde (siehe Abb. 3.2). Vergleichend zum ersten Screening konnten die Periodenphänotypen der Einzeldepletionen weitgehend reproduziert werden, wobei sich generell deutlich stärkere circadiane Effekte abzeichneten, was vermutlich auf eine höhere Viruslast und daher bessere mRNA-Depletion zurückzuführen ist. Bei Mehrfachdepletion der unterschiedlichen katalytischen Untereinheiten von *Pp1*, *Pp2A*, *Pp3* und *Pp7* konnten zum Teil deutlich verstärkte Periodeneffekte detektiert werden als in den Einzeldepletionen. Wie am Beispiel von *Pp7* zu sehen, verkürzte die Einzeldepletion der jeweiligen katalytischen Untereinheiten *ca* und *cb* die Periode nur geringfügig (weniger als 0,5 h), die mRNA Depletion beider Untereinheiten zusammen allerdings um ca. 1,5 h. Wären die Effekte rein additiv, wäre die Verkürzung um 1,5 Stunden zu viel, was auf einen Redundanzeffekt schließen lassen würde. Allerdings wären aber auch für den Fall von reiner Redundanz keine Periodenphänotypen in den Einzeldepletionen von *Pp7ca* und *Pp7cb* zu erwarten gewesen. Demzufolge ist nicht eindeutig zwischen Redundanzeffekten und additiven Effekten in diesem methodischen Ansatz zu diskriminieren.

Interessanterweise waren bei der Depletion der katalytischen Untereinheiten von PP2A, PP3 und PP7 sehr starke Amplitudenreduktionen zu beobachten (siehe Abb. 3.2). Das

kann ein Hinweis darauf sein, dass Ser/Thr-Phosphatasen nicht nur die Geschwindigkeit der Oszillation modulieren können, sondern deren Aktivität auch generell für eine robuste Oszillation mit hoher Amplitude von Bedeutung ist. Grundsätzlich ist aber auch zu bedenken, dass die Ursache eines veränderten circadianen Phänotyps durch verminderte Aktivität einer Phosphatase nicht notwendigerweise einen direkten Regulationsmechanismus auf die molekulare Uhr bedingt. Da Phosphatasen in nahezu allen Signalwegen der Zelle Funktionen ausüben, könnten auch Prozesse beeinträchtigt werden, die mit der molekularen Uhr vernetzt sind, wie beispielsweise die Kontrolle des Zellzyklus. Eine Rückkopplung solcher globalen zellulären Effekte auf den molekularen Uhrmechanismus ist dadurch denkbar.

#### 4.1.3 PROTEIN PHOSPHATASE 4 ALS POTENTIELLER REGULATOR DER CIRCADIANEN UHR

Als circadiane Uhr wird ein intrazellulärer Oszillator bezeichnet, der autonom eine Periode von ca. 24 Stunden besitzt. Dieser Oszillator besteht aus diversen biochemischen, zellbiologischen Prozessen – wie Transkription, Translation, nukleären Import und Export – und spiegelt sich in der rhythmischen Abundanz von z. B. Uhrgen-mRNA und Protein wider. Aufgrund theoretischer Überlegungen hätte ein solches System, bestehend aus gekoppelten, rein biochemischen Reaktionen, nur eine Periode von wenigen Stunden. Eine grundlegende, daraus resultierende Annahme ist, dass weitere regulative Prozesse in der Zelle diese Periode verlängern – einige eventuell auch als individuelle Gegenspieler die Periode verkürzen – und somit ein ausbalanciertes Gleichgewicht herstellen, um die Oszillation auf 24 Stunden zu justieren. Die spezifische Depletion von einzelnen Genen in einem Zellkultursystem, in dem spezifische Parameter der Oszillationsdynamik ausgelesen werden können, würde jene Gene identifizieren, dessen Proteine in dem Prozess der zeitlichen Verzögerung involviert sind. Erwartungsgemäß sollten hier viele Gene gefunden werden, die bei Depletion zu einer verkürzten Periode führen, somit also physiologisch zu einer Verlängerung der Periode beitragen. Interessanterweise sind aber kurze Perioden-Phänotypen – induziert durch *loss-of-function*-Experimente – aus bisher noch ungeklärten Gründen in der circadianen Uhr von Säugern nur selten zu finden [Zhang et al., 2009; Maier et al., 2009], obwohl diese theoretisch (siehe oben) vermehrt zu erwarten wären.

Umso interessanter scheint der im Screening gefundene circadiane Phänotyp von *Pp4c* zu sein: Die RNAi vermittelte mRNA-Depletion der katalytischen Untereinheit von Protein Phosphatase 4 (*Pp4c*) führte spezies- und gewebeübergreifend zu einer signifikant kürzeren circadianen Periode (siehe Abb. 3.4). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte *PP4c* Gendosis durch ektopische Überexpression die circadiane Oszillationsdynamik – vor allem die Amplitude der Oszillation – substanziell beeinflusst (siehe Abb. 3.5/3.6). Zur Klärung der physiologischen Relevanz von PP4c für den gesamten Organismus wäre es notwendig zu testen, ob sich eine fehlende PP4c-Aktivität auch in einem veränderten circadianen Verhalten manifestiert, denn durch Zellkulturexperimente allein lässt sich darauf nicht rückschließen. Aktivitätsrhythmen können z. B. mit Mäusen in isolierten Käfigen unter definiertem Lichtregime (wie konstanter Dunkelheit) durch das individuelle Laufradverhalten analysiert werden. Da *Pp4c* deletierte Mausembryonen letal sind und somit die Aufzucht von *Pp4c Knockout*-Mäusen nicht möglich ist, wäre eine Alternative die Verwendung von induzierbaren *Pp4c Knockout*-Mäusen. Eine zusätzliche Kreuzung solcher Tiere mit den bekannten PER2::LUC Mäusen, die ein mit Luciferase fusioniertes PER2 Protein unter dem endogenem *Per2*-Promotor exprimieren, würde sogar das Auslesen der circadianen Oszillationsdynamik in unterschiedlichen explantierten Geweben ermöglichen und bietet den Vorteil, dass eventuelle unspezifische Effekte von verwendeten shRNAs oder unerwünschte Nebeneffekte der viralen Transduktion generell ausgeschlossen werden können.

Die zentrale Frage ist jedoch durch welchen Mechanismus PP4c die circadiane Oszillationsdynamik von Säugern beeinflussen kann? Als Regulator von fundamentalen zellulären Prozessen, wie beispielsweise der Mikrotubuliorganisation an Centrosomen, der Assemblierung des Splicosoms und der Regulation von Apoptose, spielt PP4c eine zentrale Rolle [Cohen et al., 2005]. Eine funktionelle Assoziation von PP4c mit der circadianen Uhr von Säugern ist bisher jedoch nicht bekannt. Eine regulative Rolle von PP4c ist bislang ausschließlich im circadianen Modellorganismus *Neurospora* beschrieben [Cha et al., 2008]: Einerseits wird dort durch PP4c-vermittelte Dephosphorylierung der negative Regulator FREQUENCY stabilisiert, andererseits wird die nukleäre Akkumulation und die Aktivierung der positiven Transkriptionsfaktoren WHITE COLLAR COMPLEX 1/2 begünstigt. Interessanterweise führte die Deletion des *Pp4c* Gens in *Neurospora* auch zu einem etwa 3

Stunden verkürzten circadianen Rhythmus in der Konidienbildung. Da viele posttranslationale Regulationen im circadianen Uhrmechanismus speziesübergreifend konserviert sind, könnte PP4c in Säugern eine ähnliche Rolle wie in *Neurospora* spielen.

### 4.2 MECHANISTISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONELLEN RELEVANZ VON PP4C

#### 4.2.1 DIE *Pp4c* GENDOSIS BEEINFLUSST DIE TRANSKRIPTION VON CIRCADIANEN UHRGENEN

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine veränderte Gendosis von *Pp4c* einen substanziellen Einfluss auf die Genexpression von circadian regulierten Uhrgenen hat (siehe Kapitel 3.3.1 und Abb 3.7/3.8). Bei diesen Experimenten wurde davon ausgegangen, dass eine Veränderung der *Pp4c* Gendosis – durch spezifische mRNA-Depletion oder ektopische Überexpression – eine gleichsinnige Änderung der Proteinabundanz, sowie Aktivität von PP4c zur Folge hat. Somit ist anzunehmen, dass die Modulation der Phosphataseaktivität von PP4c die veränderte Transkription einzelner Uhrgene bewirkt und so eine veränderte Dynamik des molekularen circadianen Oszillators verursacht.

Eine weitere, naheliegende Annahme ist, dass eine Verringerung der Gendosis von *Pp4c* im Vergleich zur Überexpression auch entgegengesetzte Effekte auf die Uhrgenexpressionen hervorruft, wenn PP4c an einer singulären Stelle im Uhrwerk angreift. Interessanterweise zeigten sich aber keine reziproken Veränderungen bezüglich der Genexpression von Uhrgenen (siehe Abb. 3.7/3.8). Dies könnte zum einen durch sogenannte *Off-Target* Effekte erklärt werden, die sowohl bei einer ektopischen Überexpression, als auch der Verwendung von shRNA auftreten können. Auch könnte es sein, dass Effekte der *Pp4c* Überexpression nicht durch den gleichen Mechanismus vermittelt werden wie die der *Pp4c*-Depletion. Zum anderen ist wenig wahrscheinlich, dass ein derartig rückgekoppeltes System wie der circadiane Uhrmechanismus einfachen, linearen Gesetzen folgt. Der molekulare circadiane Oszillator basiert auf einem Regulationsmechanismus, dessen Dynamik durch ein Netzwerk von diversen Elementen gesteuert wird, die erst durch Rückkopplungen und Verzögerungen zu einem oszillierenden System führen. Solche Rückkopplungen machen eine Vorhersage auf das Verhalten des gesamten Systems sehr schwierig, wenn es an einer Stelle pertubiert

wird. Um dennoch aus den Genexpressionsanalysen einen potentiellen PP4c Mechanismus abzuleiten, wurden die Datensätze der *Pp4c* mRNA-Depletion und Überexpression entkoppelt voneinander betrachtet und daraus zwei Arbeitsmodelle formuliert, die im folgenden diskutiert werden.

#### 4.2.2 HYPOTHESE 1: PP4C WIRKT AUF DIE *Bmal1*-TRANSKRIPTION AKTIVIEREND

Durch die spezifische *Pp4c* mRNA-Depletion war vor allem eine deutliche Inhibition der *Bmal1*-Transkription zu beobachten, die auch mit der verringerten Magnitude der Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen übereinstimmte (siehe Abb. 3.7). Aufgrund dieser Effekte wurde die Hypothese aufgestellt, dass PP4c möglicherweise eine aktivierende Funktion direkt auf den *Bmal1*-Promotor ausübt, was indirekt auch die Transkription von E-Box getriebenen Uhrgenen begünstigen könnte (siehe Kapitel 3.3.2 und Abb. 3.9).

Wie könnte die *Bmal1*-Transkription durch PP4c reguliert werden? Ein fundamentaler Mechanismus der Transkriptionsregulation ist die epigenetische Kontrolle von Genen durch Histonmodifikationen in den jeweiligen Promotoren, wie beispielsweise Phosphorylierung, Methylierung oder Acetylierung. Diese komplex regulierten Modifikationen an Histonen erlauben eine dynamische Chromatinstrukturierung, die einen Promotorbereich temporär und lokal für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich macht [Jenuwein und Allis, 2001]. In diesem Kontext gibt es zahlreiche Publikationen, die einen funktionalen Zusammenhang zwischen Histonmodifikationen und circadianen Genexpressionen demonstrieren [Etchegaray et al., 2003; Masri und Sassone-Corsi, 2010; Ripperger und Schibler, 2006; Koike et al., 2012]. Ein essentieller Mechanismus ist dabei die Acetylierung von Lysinresten (K9 und K14) an Histon 3 (H3) durch Histonacetyltransferasen (HAT), die mit einer aktiven Gentranskription korreliert. Die Entfernung von Acetylgruppen dieses Lysinrestes durch Histondeacetylasen (HDAC) hingegen reprimiert die Transkription. Circadiane Oszillationen im Acetylierungsgrad von Histonen treten sowohl in Promotoren von Uhrgenen, als auch genomweit auf [Feng et al., 2011; Koike et al., 2012]. Innerhalb der positiven Rückkopplungsschleife wird die *Bmal1*-Transkription durch die Histondeacetylase HDAC3 reguliert. Durch die tageszeitspezifische Rekrutierung von REV-ERB $\alpha$ , Co-Repressor N-CoR1 und

HDAC3 an das cis-regulatorische RRE-Element im *Bmal1*-Promotor werden Histone in diesem Promotorbereich deacetyliert und die *Bmal1*-Transkription damit zu bestimmten Tageszeiten reprimiert [Preitner et al., 2002; Yin und Lazar, 2005; Ueda et al., 2005; Liu et al., 2008]. Interessanterweise wird die enzymatische Aktivität von HDAC3 nicht nur durch die Assoziation mit den Co-Repressoren bestimmt, sondern auch durch reversible Phosphorylierung an Serin 424 durch Casein Kinase 2 und PP4c reguliert, deren spezifische Funktion bisher allerdings noch ungeklärt ist [Zhang et al., 2005]. Die HDAC3-Aktivität wird dabei negativ durch die intrazelluläre *Pp4c* Gendosis reguliert. In Bezug auf die Hypothese, dass PP4c auf den *Bmal1*-Promotor wirkt, könnte demnach eine verringerte *Pp4c* mRNA-Expression (durch RNAi-vermittelte mRNA-Depletion) zu einer höheren HDAC3-Aktivität führen und so die repressorische Funktion des REV-ERB $\alpha$ /N-CoR1/HDAC3 Komplexes am *Bmal1*-Promotor verstärken. Dadurch ließe sich die verringerte *Bmal1*-Expression in den *Pp4c*-depletierten Zellen erklären.

Unterstützt wurde diese Annahme durch die Analyse der transkriptionellen Aktivität eines Promotorfragmentes in einem Luciferase-Reportergen-Assay, welches das cis-regulatorische RRE-Element des *Bmal1*-Promotors enthält (siehe Abb. 3.10). Die ektopische Expression von *Pp4c* führte einerseits zu einer verstärkten Transaktivierung von ROR $\gamma$  und andererseits zu einer Inhibition der repressorischen Aktivität von REV-ERB $\alpha$ /HDAC3. Beides ist durch eine schwächere HDAC3-Aktivität, bedingt durch die erhöhte *Pp4c* Gendosis, erklärbar. Wie könnte PP4c über die HDAC3-Aktivität in diesen Prozess eingreifen? Bekannt ist, dass die Phosphorylierung weder die Assoziation der Co-Repressoren, noch die subzelluläre Lokalisation von HDAC3 beeinflusst [Zhang et al., 2005]. Möglicherweise inhibiert die Dephosphorylierung von HDAC3 durch PP4c die Rekrutierung des gesamten Repressorkomplexes an die genomische DNA und/oder supprimiert die HDAC3 vermittelte Deacetylierung von Histonen.

Die Chromatin-Immunpräzipitationen gaben Hinweise darauf, dass tatsächlich die DNA-Bindung und somit die Aktivität von HDAC3 durch PP4c beeinflusst wird (siehe Abb. 3.11A): Die circadiane Rekrutierung von HDAC3 an das RRE-Element im *Bmal1*-Promotor in U-2 OS Zellen ist mit publizierten Daten in Mausleber konsistent [Feng et al., 2011]. Obwohl HDAC3 innerhalb eines circadianen Zyklus nicht rhythmisch exprimiert ist, wurde in der Leber gezeigt, dass die Rekrutierung von HDAC3 an DNA tageszeitlich



schwankt und mit der Bindung der Co-Repressoren REV-ERB und N-CoR1 korreliert, wohingegen der Acetylungsgrad von Histon H3 und die Rekrutierung von PolII antiphasisch waren. Sowohl in wildtypischen, als auch in *Pp4c* depletierten U-2 OS Zellen konnte eine inverse Beziehung zwischen der HDAC3-Bindung und der entsprechenden *Bmal1* mRNA-Expression festgestellt werden, die mit der transkriptionellen Repression von HDAC3 korreliert. Das erhöhte Level der HDAC3-Bindung in *Pp4c* depletierten Zellen zu bestimmten Zeitpunkten korreliert zudem gut mit dem Befund, dass eine verringerte PP4c-Aktivität zu einer erhöhten HDAC3-Aktivität führt [Zhang et al., 2005]. So könnte die verringerte *Bmal1*-Magnitude in *Pp4c* depletierten Zellen erklärt werden.

Eine circadiane Oszillation der Acetylierung von Histon 3 Lysin 9 (Ac H3-K9) wurde bereits an E-Boxen im murinen Dbp-Gen gezeigt [Ripperger und Schibler, 2006]. Ähnliche Ergebnisse konnten für das RRE-Element im *Bmal1*-Promotor von U-2 OS Zellen gefunden werden (siehe Abb. 3.11B). Dabei ist der Acetylungsgrad sowohl in wildtypischen, als auch in *Pp4c* depletierten Zellen erwartungsgemäß invers zur HDAC3-Bindung. Jedoch sieht man in *Pp4c* depletierten Zellen – im Widerspruch zu der vermehrten HDAC3-Bindung in diesen Zellen – keinen geringeren Acetylungsgrad, sondern tendenziell sogar eher ein erhöhtes Level. Ein Grund dafür könnte sein, dass HDAC3 womöglich nicht die einzige Deacetylase ist, die den Acetylungsgrad von H3-K9 bestimmt. Tatsächlich sind weitere Deacetylases bekannt, wie beispielsweise SIRT oder SIN3A/HDAC1, die ebenfalls H3-K9 deacetylieren und zum rhythmischen Acetylierungsprofil beitragen können [Feng und Lazar, 2012; Nakahata et al., 2008; Duong et al., 2011].

Insgesamt sprechen die Daten durchaus dafür, dass PP4c über HDAC3 direkt auf den *Bmal1*-Promotor aktivierend wirken könnte. Zusätzlich konnten auch von der *Pp4c* Gendosis abhängige Phasenunterschiede im Bindungsverhalten von HDAC3 beobachten werden, die eventuell auf eine kurze Periode hindeuten. Wenn PP4c tatsächlich über HDAC3 in den circadianen Uhrmechanismus eingreift, dann sollte bei gleichzeitiger Depletion von *Pp4c* und *Hdac3* kein kurzer Periodenphänotyp mehr induziert werden. Die zusätzliche Depletion der *Hdac3* mRNA hatte jedoch keinen Einfluss auf die durch *Pp4c*-Depletion induzierte verkürzte Periode (siehe Abb. 3.12). Eine plausible Erklärung dafür könnte sein, dass die eventuell verbliebene Restaktivität von HDAC3 hinreichend ist um die normale Funktion zu erfüllen. Eine vollständige Deaktivierung der HDAC3-Aktivität könnte nur durch die

Verwendung von Zellen einer *Hdac3 Knockout*-Maus erreicht werden. Eine andere Erklärung wäre, dass PP4c noch weitere, von HDAC3 unabhängige, Funktionen im Uhrmechanismus erfüllt. Zudem könnte HDAC3 unabhängig von der epigenetischen Kontrolle der *Bmal1*-Transkription auch noch in andere Mechanismen involviert sein. Diesbezüglich könnte HDAC3 nicht nur für die Deacetylierung von Histonen verantwortlich sein, sondern auch durch Deacetylierung von Uhrproteinen deren spatio-temporale Funktionen innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife regulieren. Am Beispiel von SIRT1, einer NAD<sup>+</sup>-abhängigen Protein Deacetylase, die in einem circadianen Rhythmus mit CLOCK/BMAL1 interagiert und die Deacetylierung und Degradation von PER2 fördert [Asher et al., 2008], wird deutlich, dass auch die reversible Acetylierung von Uhrproteinen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der normalen Oszillationsdynamik spielt.

#### 4.2.3 HYPOTHESE 2: PP4C WIRKT INHIBIEREND AUF DIE E-BOX GETRIEBENE TRANSKRIPTION VON UHRGENEN

Die ektopische Überexpression von *Pp4c* in U-2 OS Zellen führte zu einer zum Teil drastischen Reduktion der Amplituden und Magnituden von E-Box kontrollierten Genen. Dies führte zur Hypothese, dass PP4c direkt auf die E-Box getriebene Uhrgenexpression inhibierend wirkt (siehe Abb. 3.8 und Abb. 3.9).

Die identifizierten Interaktionen von PP4c mit den Proteinen PER1, PER2 und CRY2 des inhibitorischen Komplexes (siehe Abb. 3.13), deuten darauf hin, dass insgesamt die Aktivität dieses Repressorkomplexes auf CLOCK/BMAL1 gestärkt ist. Da sämtliche Funktionen der PER/CRY-Proteine durch spatio-temporale Phosphorylierungsreaktionen an Serin/Threonin-Aminosäuren reguliert werden, gibt es viele Möglichkeiten, wie PP4c in diese Prozesse involviert sein könnte. Neben einer direkten Aktivierung der repressorischen Aktivität von CRY1/2, könnte beispielsweise auch die multimere PER/CRY-Komplexbildung im Cytoplasma und der Kernimport oder die nukleäre Retention von PER/CRY verstärkt sein, um eine erhöhte Repressoraktivität im Kern zu erzielen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Casein Kinase 1 $\epsilon$  PER1 phosphoryliert und damit das Kernlokalisationsignal maskiert und zu einer cytoplasmatischen Retention führt [Vielhaber et al., 2000]. Ebenso reduziert eine Phosphorylierung von MAPK/ERK die repressorische Aktivität von CRY1/2 [Sanada et al., 2004]. Eine Dephosphorylierung durch PP4c könnte diesen beiden Prozes-

sen entgegenwirken und zu einer erhöhten PER/CRY-Repressoraktivität und damit zu Transkriptionseinhibitionen von E-Box kontrollierten Genen führen.

Insbesondere die Regulation der Stabilität von Uhrproteinen stellt einen kritischen Schritt für eine normale circadiane Oszillationsdynamik dar. Könnte also eine vermehrte Dephosphorylierung durch PP4c zu veränderten Proteinstabilitäten führen, die sich dann wiederum auf die Transkription von E-Box getriebenen Genen auswirken? Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass eine verminderte PP4c-Aktivität (durch spezifische mRNA Depletion von *Pp4c*) zu veränderten Proteinstabilitäten von PER1/2, CLOCK und BMAL1 führte (siehe Abb. 3.14). Zudem konnten keine Aussagen über die CRY1/2 Stabilität getroffen werden, da die CRY-Fusionsproteine eine zu schwache Luciferase-Aktivität zeigten und nicht ausgewertet werden konnten. Entweder spielt also PP4c tatsächlich keine Rolle für die Stabilität von Uhrproteinen, oder technische Limitationen machten eine Detektion von Stabilitätsänderungen unmöglich. Unter den durchgeführten Versuchsbedingungen wurden zu jedem gemessenen Zeitpunkt der gesamte Pool an Proteinmolekülen in nicht-synchronisierten Zellen analysiert. Das bedeutet, dass sich jedes Molekül in einem anderen funktionalen Phosphorylierungszustand befinden könnte. Wenn PP4c dabei nur auf einen geringen Prozentsatz regulativ wirken kann – etwa nur auf Proteine, die entweder im Kern oder im Cytoplasma lokalisiert sind – könnten Stabilitätseffekte auch maskiert sein. Besser wäre es demnach, die Stabilität von endogenen Proteinen im Nucleus und Cytoplasma getrennt voneinander zu analysieren.

In Bezug auf die Stabilitätsuntersuchungen konnte also nicht eindeutig geklärt werden, ob PP4c eine Rolle für die Regulation des inhibitorischen Proteinkomplexes spielt. Ob PP4c möglicherweise in den zeitlich regulierten Kernimport/-export von PER/CRY eingreift, müsste in weiteren Studien untersucht werden. Allerdings könnte PP4c auch unabhängig von der Kontrolle des repressorischen PER/CRY-Komplexes direkt als Inhibitor der CLOCK/BMAL1-vermittelten Transaktivierung von E-Box getriebenen Uhrgenen fungieren, beispielsweise durch Verhinderung der Bindung von CLOCK/BMAL1 an die DNA oder durch Reduktion der transkriptionellen Aktivität des CLOCK/BMAL1-Komplexes. Zudem ist in der Literatur beschrieben, dass PP4c hauptsächlich im Nucleus lokalisiert ist [Kloeker et al., 1997], was die Annahme stützt, dass PP4c eine entscheidende Funktion in der Regulation des Transaktivatorkomplexes spielt.

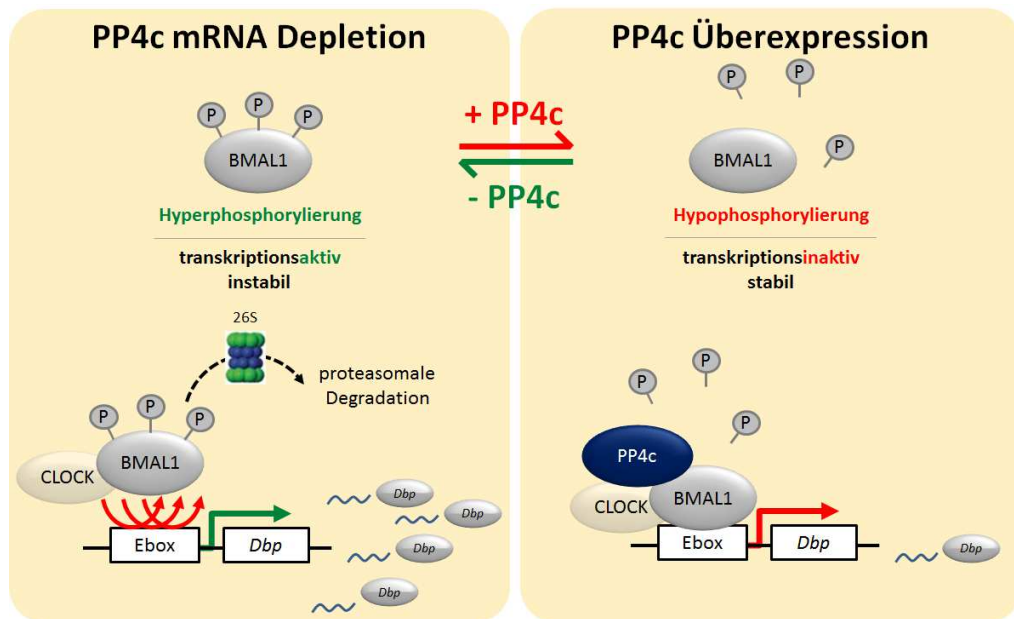
Zwar konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Interaktion mit PP4c und CLOCK/BMAL1 nicht nachgewiesen werden, allerdings war tatsächlich die CLOCK/BMAL1 vermittelte Transaktivierung an E-Boxen bei ektopischer Überexpression von *Pp4c* deutlich reprimiert (siehe Abb. 3.15). Das spricht für die Hypothese, dass eine gesteigerte PP4c-Aktivität auf die CLOCK/BMAL1 vermittelte E-Box getriebene Transkription inhibierend wirkt. Für diesen Effekt gibt es zwei plausible Erklärungen: Erstens könnte durch *Pp4c* Überexpression direkt die Transkription von *Clock* und/oder *Bmal1* inhibiert werden, infolgedessen könnte die Abundanz der Proteine und damit die Transaktivierung vermindert sein. Allerdings ist es sehr unwahrscheinlich, dass PP4c die Transkription beider Gene durch Regulation des artifiziellen CMV-Promotors beeinflusst. Zweitens könnte PP4c direkt den Phosphorylierungsstatus von CLOCK/BMAL1 regulieren und damit das Bindungs- oder Transaktivierungsverhalten an die DNA beeinflussen.

Die Inhibition der BMAL1-Bindung an die DNA ist dabei ein denkbarer Mechanismus, wie eine erhöhte *Pp4c* Gendosis die transkriptionelle Aktivität von BMAL1 reduzieren könnte. Interessanterweise führte die Überexpression von *Pp4c* aber teilweise zu einer verstärkten BMAL1-Bindung an die E-Box im *Rev-erba*-Promotor, vor allem zu circadianen Zeiten, in denen man BMAL1 maximal phosphoryliert erwarten würde (ca. 24 bzw. 44 Stunden nach Synchronisation, entsprechend etwa CT6–10 in Mausleber) (siehe Abb. 3.16B). Das spricht dafür, dass PP4c tatsächlich ein Regulator der Phosphorylierung von CLOCK/BMAL1 sein könnte. Die Diskrepanz zwischen den signifikant erniedrigten Magnituden von E-Box getriebenen Transkripten und der phasenspezifisch verstärkten Bindung von BMAL1 bei Überexpression von *Pp4c*, ist ein Hinweis darauf, dass die BMAL1-Aktivität nicht notwendigerweise mit dessen DNA-Bindung direkt korreliert.

Zwei Modelle der transkriptionellen Regulation – das „Kamikaze“ [Thomas und Tyers, 2000; Chi et al., 2001]- bzw. „black widow“-Modell [Muratani und Tansey, 2003; Tansey, 2001; Kodadek et al., 2006]– basieren auf der Annahme, dass eine Ubiquitin-vermittelte proteasomale Degradation eines Transkriptionsfaktors mit dessen Phosphorylierung und transkriptionellen Aktivität gekoppelt ist. Demnach ist es wahrscheinlich, dass auch der Phosphorylierungsgrad von BMAL1 sowohl dessen Aktivität als auch Proteinstabilität bestimmt, wie es bereits in Kondratov et al. [2003] diskutiert wurde. In einer Publikation von Stratmann et al. [2012] wurde ebenfalls ein Szenario favorisiert, dass zu circadia-

nen Zeiten wenn CLOCK/BMAL1 an E-Boxen gebunden ist, BMAL1 phosphoryliert, mono-ubiquitiniert und aktiv ist. Die darauffolgende Polyubiquitinierung führt zur Inaktivierung der CLOCK/BMAL1-vermittelten Transaktivierung und markiert BMAL1 für den proteasomalen Abbau. Als Folge der Proteolyse wird der inaktive Komplex von den E-Boxen entfernt und erlaubt die Bindung eines neues CLOCK/BMAL1-Heterodimers. Entsprechend dieses Modells würde eine durch Dephosphorylierung von PP4c induzierte Hypophosphorylierung von BMAL1 zu einem inaktiven, aber stabilen BMAL1 Protein führen, wodurch möglicherweise das Promotor-*Clearing* durch den verhinderten proteasomalen Abbau verlangsamt wird (siehe Abb. 4.1). Dies würde erklären, weshalb die Überexpression von *Pp4c* phasenspezifisch mit einer vermehrten BMAL1-Bindung an die E-Box im *Rev-erba*-Promotor korreliert. Für diese These sprechen auch die durch PP4c reduzierte CLOCK/BMAL1 vermittelte Transaktivierung und die niedrigen Expressionslevel von E-Box getriebenen Uhrgenen.

Im Widerspruch zu dieser Hypothese scheint aber die ebenso verstärkte Bindung von BMAL1 durch *Pp4c*-Depletion zu stehen (siehe Abb. 3.16A). Allerdings könnte es sich auch um eine Fehlinterpretation der Ergebnisse der Chromatin-Immunpräzipitationen handeln, da man hierbei nur das statische Verhalten der BMAL1-Bindung analysieren kann und keine Aussagen über die Dynamik der Bindung treffen kann. Es könnte also sein, dass die sehr präzise und komplex regulierten kinetischen Prozesse der BMAL1-Bindung, transkriptionellen Aktivierung, Promotor-*Clearing* und proteasomaler Abbau, sowie die Neubesetzung der freien Transkriptionsfaktorbindestelle durch PP4c moduliert werden. Demnach wäre durch *Pp4c*-Depletion hyperphosphoryliertes BMAL1 vermehrt transaktiv, würde aber wiederum schnell dem proteasomalen Abbau unterliegen und die Bindungsstellen für ein neues BMAL1 Protein frei machen. Man könnte somit spekulieren, dass im Vergleich zum Wildtyp insgesamt die Zeit zwischen der BMAL1-Bindung und erneuten Besetzung der E-Box verkürzt ist. Daraus würde sich eine erhöhte Wechselzahl ergeben, die in der statischen Analyse der Chromatin-Immunpräzipitationen die erhöhte BMAL1-Bindung durch *Pp4c*-Depletion erklären könnte (siehe Abb. 4.1). Ein möglicher Ansatz um diese Theorie zu verifizieren, wäre dabei eine von Stratmann et al. [2012] publizierte Methodik. Unter Verwendung von FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) könnte die Dynamik und Kinetik der BMAL1-Bindung und deren Modulation durch PP4c an einem



**Abb. 4.1: Modell einer PP4c-Funktion in der circadianen Uhr von Säugern.**

Modell einer direkten Regulation des Phosphorylierungsstatus von BMAL1 durch PP4c, wodurch das Bindungsverhalten und die transkriptionelle Aktivität von BMAL1 moduliert wird. **(Links)** Als Folge einer Depletion der PP4c-Aktivität bindet hyperphosphoryliertes BMAL1 an die E-Box von Uhrgenen, wie beispielsweise *Dbp*, und aktiviert deren Transkription. Infolge der vermehrten Phosphorylierung unterliegt BMAL1 wiederum einem schnellen proteasomalen Abbau. Dadurch wird die Zeitspanne zwischen der BMAL1-Bindung, der Transaktivierung, dem proteasomalen Abbau und einer erneuten Besetzung der E-Box beschleunigt, woraus eine erhöhte BMAL1-Wechselzahl resultiert (rote Pfeile), die in einer höheren Transkriptionsrate von E-Box getriebenen Uhrgenen resultiert. **(Rechts)** Die Überexpression von *Pp4c* führt zu hypophosphoryliertem BMAL1, das transkriptionsinaktiv ist und eine Repression der Uhrgentranskription bewirkt. Durch geringere Phosphorylierung kann BMAL1 nicht effizient abgebaut werden, so dass es phasenspezifisch– zu circadianen Zeiten, wenn BMAL1 normalerweise phosphoryliert vorliegt und aktiv ist– zu einer permanenten Besetzung von BMAL1 an die DNA kommt.

artifiziellen E-Box enthaltenen Promotor in vitalen Zellen und in Echtzeit untersucht werden.

Wenn allerdings eine Hyperphosphorylierung von BMAL1 durch *Pp4c*-Depletion zu einer verstärkten Transaktivierung führt, dann würde man als Konsequenz auch eine erhöhte Genexpression von E-Box getriebenen Uhrgenen erwarten (siehe Abb. 3.7). Erhöhte Magnituden von E-Box regulierten Uhrgenen in U-2 OS Zellen konnten aber nicht beobachtet werden. Dies kann einerseits daran liegen, dass im rückgekoppelten System der circadianen Uhr sehr wahrscheinlich keine einfachen, linearen Beziehungen bestehen. Andererseits muss beachtet werden, dass die mRNA-Depletion von *Pp4c* zu einer stark verkürzten Periode führt und dadurch vielleicht sämtliche Teilprozesse innerhalb der negativen

Rückkopplungsschleife zeitlich reduziert sind, wie beispielsweise die posttranskriptionelle Akkumulation von mRNA. Wenn die mRNA also weniger akkumulieren kann, ist eine potentielle Expressionsverstärkung einzelner Uhrgene womöglich gar nicht detektierbar. Die Quantifizierung von mRNA ist also nicht geeignet, um diese Prozesse weiter aufzuschlüsseln, da sich die Abundanz von mRNA immer aus einem Gleichgewicht der Transkriptionsrate, mRNA Prozessierung, Abbau von mRNA und Translation zusammensetzt. Eine geeignete Methodik um Rückschlüsse über die Kinetik der durch CLOCK/BMAL1 kontrollierten RNA-Synthese von E-Box kontrollierten Uhrgenen auf dem Level der Transkriptioninitiation zu ziehen, wäre die tatsächliche Neusynthese, die sog. nascent RNA, zu messen [Menet et al., 2012].

### 4.3 AUSBLICK

Posttranslationale Modifikationen – besonders die Phosphorylierung von essentiellen Uhrproteinen durch Kinasen – spielen eine entscheidende Rolle für die Generierung und Aufrechterhaltung von circadianen Rhythmen. Um einen tieferen Einblick in die Komplexität des circadianen Uhrwerks und das Zusammenspiel der zugrunde liegenden geschwindigkeitsbestimmenden, regulatorischen Prozesse zu bekommen, war die zentrale Fragestellung dieser Arbeit, inwiefern die Aktivität von Ser/Thr-Phosphatasen für eine normale circadiane Oszillationsdynamik in Säugern relevant ist.

Ein entscheidendes Ergebnis dieser Arbeit war, dass die Aktivität von Protein Phosphatase 4c für eine normale circadiane Oszillationsdynamik erforderlich ist. Mechanistische Analysen machten deutlich, dass PP4c potentiell ein neuer Regulator der circadianen Uhr von Säugern ist, indem diese Phosphatase wahrscheinlich direkt im Uhrmechanismus eingreift und multiple Funktionen übernimmt. Diesbezüglich konnten Hinweise geliefert werden, dass einerseits PP4c innerhalb der positiven Rückkopplungsschleife direkt die *Bmal1*-Expression über RRE-Elemente im *Bmal1*-Promotor reguliert. Andererseits könnte PP4c innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife die Bindung von BMAL1 an die DNA modulieren und somit die E-Box getriebene Genexpression regulieren. Zum genaueren Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und zur weiteren Aufklärung der funktionalen Relevanz von PP4c im circadianen Uhrmechanismus von Säugern

sind jedoch weitere experimentelle Ansätze notwendig. Ein weiteres Vorgehen diesbezüglich kann auf verschiedenen Ebenen fortgesetzt werden: Es sollte dabei insbesondere auf die experimentelle Validierung bzw. Falsifizierung des in dieser Arbeit aufgestellten BMAL1/PP4c-Modells (siehe Abb. 4.1) fokussiert werden. In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass PP4c direkt den Phosphorylierungsstatus von BMAL1 und damit dessen Stabilität, Bindungsverhalten an die DNA und die transkriptionelle Aktivität moduliert.

Ein wichtiger Nachweis diesbezüglich wäre der einer direkten Interaktion von PP4c mit BMAL1. Da diese Interaktion möglicherweise vom Phosphorylierungsstatus von BMAL1, bzw. von einem spezifischen circadianen Zeitpunkt, abhängig sein könnte, sollte dies mit endogenen Proteinen in zeitlicher und räumlicher Auflösung erfolgen. Obwohl die Genexpression von *Pp4c* nicht rhythmisch ist, könnte trotzdem eine phasenspezifische Bindungskinetik bestehen. Diese könnte sich beispielsweise aus einer zeitlich organisierten Lokalisation in den Kern ergeben. Weiterhin ist aber auch eine zeitlich abgestimmte Rekrutierung regulativer, Substratspezifität vermittelnder, Untereinheiten des PP4c Holoenzym denkbar. Diesbezüglich gibt es schon Hinweise, die im Rahmen dieser Arbeit in einem spezifischen Screening nach regulativen PP4c Untereinheiten, die eine Veränderung der Oszillationsdynamik hervorrufen, gefunden wurden (siehe Anhang Abb. 4). Dabei zeigte nur die regulatorische Untereinheit *Pp4r2* nach Depletion einen Periodeneffekt, der mit einer signifikant kurzen Periode mit dem Phänotyp der *Pp4c* mRNA-Depletion übereinstimmte. Somit ist PP4R2 ein interessanter Kandidat, der in seiner Abundanz und der Bindungskinetik mit PP4c näher untersucht werden sollte. Allerdings darf eine indirekte Interaktion von PP4c mit einem anderen Regulator, der mit BMAL1 funktionell assoziiert ist (beispielsweise De-/Acetylasen oder CLOCK), nicht ausgeschlossen werden, da die Funktionen von BMAL1 nicht nur durch reversible Phosphorylierung, sondern auch durch weitere posttranslationale Modifikationen – wie zum Beispiel Acetylierung und Sumoylierung – reguliert werden. Somit ist die direkte Interaktion von PP4c mit BMAL1 nicht zwingend erforderlich, das vorgestellte Modell müsste aber in einem solchen Fall entsprechend modifiziert und erweitert werden.

Falls sich jedoch BMAL1 als direktes Target von PP4c manifestieren sollte, schließen sich weitere zentrale Fragen an: Erstens, welche spezifischen Phosphorylierungsstellen von BMAL1 werden durch PP4c dephosphoryliert? Zweitens, zu welcher circadianen Phase geschieht die Dephosphorylierung und ist die Bindung von PP4c an BMAL1 womöglich



circadian? Drittens, durch welchen Mechanismus kann die Dephosphorylierung von BMAL1 funktionell die circadiane Oszillationsdynamik beeinflussen?

Zur Beantwortung dieser Fragen gibt die Literatur einige Hinweise, die eine spezifische Untersuchung ermöglichen. So zeigen einige Publikationen einen rhythmischen Phosphorylierungsgrad von BMAL1, der mit der maximalen DNA-Bindung und transkriptionellen Aktivität sehr wahrscheinlich zeitlich korreliert [Lee et al., 2001; Koike et al., 2012; Jouffe et al., 2013; Schmutz et al., 2011]. Interessanterweise scheinen verschiedene Phosphorylierungsereignisse von BMAL1 unterschiedliche, oder sogar teilweise entgegengesetzte, Effekte zu vermitteln. So stimuliert beispielsweise eine durch CK1 $\epsilon$  induzierte Phosphorylierung die CLOCK/BMAL1-abhängige Transkription von E-Box getriebenen Uhrgenen [Eide et al., 2002]. Eine Dephosphorylierung durch PP4c könnte also theoretisch, entsprechend des hier vorgestellten Modells, diesem Effekt entgegenwirken. Auch der Bindungspartner CLOCK fördert die Phosphorylierung von BMAL1, welches transkriptionsaktiv ist, wohingegen die Inhibitoren CRY1/2 die unphosphorylierte, inaktive Form induzieren [Kondratov et al., 2003, 2006]. Da in dieser Arbeit auch eine Interaktion von PP4c und CRY2 gefunden wurde, wäre auch dies ein potentieller Mechanismus, der speziell untersucht werden könnte. Weiterhin kann aber auch eine Phosphorylierung das Gegenteil, also eine Inhibition von BMAL1, bewirken [Sanada et al., 2004], oder aber andere Funktionen vermitteln, wie die Regulation der BMAL1 Stabilität [Wallach et al., 2013; Sahar et al., 2010] und der subzelluläre Lokalisation [Tamaru et al., 2009]. Ein Gleichgewicht aus diversen Kinase-Phosphatase Aktivitäten könnte also insgesamt unterschiedliche BMAL1-Funktionen innerhalb eines circadianen Zyklus kontrollieren.

Neben der Untersuchung bereits bekannter Phosphorylierungsstellen und der dadurch regulierten BMAL1 Mechanismen, wäre allerdings ein systematischer Ansatz sinnvoll. Um möglichst umfassend die von PP4c regulierten Phosphorylierungsstellen auf BMAL1 zu identifizieren, müssten vorab sämtliche, durch endogene Kinasen phosphorylierte Aminosäuren von BMAL1 mittels massenspektrometrischer Analysen qualitativ bestimmt werden. Anschließend könnten dann die PP4c spezifischen Phosphorylierungsstellen ebenfalls durch Massenspektrometrie, allerdings in einer quantitativen Analyse, vergleichend detektiert werden. Geeignet wäre dafür SILAC, eine Methode, bei der durch die Integration Isotop markierter Aminosäuren die Abundanz von phosphorylierten Peptiden aus unterschiedlich

behandelten Zellkulturen detektiert werden kann. Der Vergleich einer PP4c aktiven mit einer PP4c inaktiven Zellkultur sollte damit die PP4c spezifischen dephosphorylierten Aminosäuren aufdecken. Im Falle einer tageszeitspezifischen Interaktion oder Aktivität müsste ein solches Experiment sogar in verschiedenen circadianen Phasen durchgeführt werden, um die Sensitivität der Messung zu erhöhen. Die Erkenntnisse aus den Protein-Interaktionsuntersuchungen von PP4c und BMAL1 sollten hierfür erste Anhaltspunkte liefern können.

Die Identifizierung der durch PP4c regulierten Phosphorylierungsstellen auf BMAL1 lässt dann gezielte Manipulationen zu, die eine biologische Funktion und den Mechanismus von PP4c aufklären können. Gängige Vorgehensweisen wären, dass identifizierte Aminosäuren, die von PP4c dephosphoryliert werden, einzeln oder auch in Kombination zu Aminosäuren verändert werden, die entweder nicht phosphoryliert werden können, oder aber auch durch ihren polaren Charakter eine angefügte Phosphatgruppe imitieren (z. B. Asparaginsäure). Wichtig für diese Experimente wäre allerdings die Einbringung solcher Mutationen direkt in das Genom, also ein *Knock-In*. Die Erzeugung solcher Mutanten in Mäusen ist auch heute noch immer relativ aufwendig. Allerdings wären die noch recht neuen methodischen Werkzeuge, wie Zinkfinger, TALENs (*transcription activator-like effectors*) oder CRISPR/Cas (*clustered regulatory interspaced short palindromic repeat*) [Gaj et al., 2013] dazu geeignet, solche Mutationen in das Genom von somatischen Zellen einzuführen.

Unabhängig von den Phosphorylierungsstellen müsste in weiteren experimentellen Ansätzen der Mechanismus des vorgestellten BMAL1-Modells überprüft werden. Die Stabilität von BMAL1 ist phasenspezifisch zu untersuchen. Weiterhin kann die Bindungskinetik von BMAL1 an die DNA mithilfe von FRAP analysiert werden und damit verbunden kann durch die Quantifizierung von neugebildeter RNA (nascent RNA) die tatsächliche Transaktivierungsaktivität von BMAL1 bestimmt werden.

Die Dynamik des circadianen Uhrwerks auf molekularer Ebene ist bis heute noch an vielen Stellen ein ungelöstes Rätsel der Chronobiologie. In dieser Arbeit wurde ein möglicher Mechanismus vorgestellt, wie auch Phosphatasen an der Regulation der circadianen Uhr beteiligt sein könnten. Wenn auch die bisherigen Ergebnisse noch keine umfassenden Erklärungen geliefert haben, wie die Aktivität von PP4c die circadiane Periode beeinflussen kann,

wird sich doch in Zukunft nach weiteren Untersuchungen zeigen, inwiefern die Interaktion von PP4c mit der circadianen Uhr ein modulativer Prozess für die Oszillationsdynamik ist.



# ANHANG

## 1 RNAi-BASIERTES CIRCADIANES SCREENING IN HUMANEN ZELLEN NACH SER/THR-PHOSPHATASEN

**Tab. 1: Gezielte genetische mRNA-Depletion katalytischer Untereinheiten humaner Ser/Thr-Phosphatasen beeinflusst die circadiane Oszillationsdynamik.**

Auswertung der circadianen Parameter der Oszillationsdynamik aus dem RNAi-basierten Screening von einzelnen katalytischen Phosphatase Untereinheiten (Isoformen *ca*, *cb* oder *cc*) in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen (vgl. Abb 3.1). Für jedes shRNA Konstrukt ist die Signifikanz (t-test) der Periodenabweichung zur Kontroll-shRNA (*non-silencing*), sowie die circadianen Parameter Periode, Amplitude, Dämpfung und Magnitude angegeben, dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten im 96-Well Format. Die rot markierten Konstrukte beziehen sich auf die rot markierten Datenpunkte in Abb 3.1A. Die Farbkodierung der *Pp4c* Konstrukte bezieht sich auf die zur Validierung des kurzen Perioden-Phänotyps in U-2 OS/*Bmal1*- bzw. *Per2-Luciferase* Reporterzellen verwendeten shRNA Konstrukte 1-3 in Abb. 3.3 und Anhang Abb. 2.

Zielgen	Konstrukt-ID	t-test	Periode MW $\pm$ SD	Amplitude MW $\pm$ SD	Dämpfung MW $\pm$ SD	Magnitude MW $\pm$ SD
<i>non-silencing</i>	RHS4346		24.74 $\pm$ 0.09	0.40 $\pm$ 0.02	1.47 $\pm$ 0.03	46253 $\pm$ 3600
<i>Pp1ca</i>	V2LHS_262414	p > 0.05	24.53 $\pm$ 0.00	0.44 $\pm$ 0.02	1.41 $\pm$ 0.01	41877 $\pm$ 1758
	V3LHS_635633	p < 0.001 ***	24.59 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.03	1.51 $\pm$ 0.07	49785 $\pm$ 3665
	V3LHS_635634	p > 0.05	24.73 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.02	1.60 $\pm$ 0.01	56568 $\pm$ 1859
	V3LHS_635635	p < 0.01 **	24.65 $\pm$ 0.11	0.37 $\pm$ 0.01	1.53 $\pm$ 0.03	61299 $\pm$ 1999
<i>Pp1cb</i>	V2LHS_220925	p < 0.001 ***	25.31 $\pm$ 0.13	0.28 $\pm$ 0.03	1.74 $\pm$ 0.06	61833 $\pm$ 3475
	V2LHS_223243	p < 0.001 ***	25.82 $\pm$ 0.29	0.40 $\pm$ 0.02	1.57 $\pm$ 0.02	32866 $\pm$ 3508
	V2LHS_276133	p > 0.05	24.54 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.02	1.43 $\pm$ 0.01	43192 $\pm$ 1676
<i>Pp1cc</i>	V2LHS_170312	p < 0.001 ***	25.33 $\pm$ 0.23	0.41 $\pm$ 0.04	1.39 $\pm$ 0.02	31881 $\pm$ 2788
	V2LHS_170308	p > 0.05	24.73 $\pm$ 0.06	0.41 $\pm$ 0.02	1.42 $\pm$ 0.01	43445 $\pm$ 254
	V3LHS_395266	p < 0.001 ***	25.09 $\pm$ 0.11	0.33 $\pm$ 0.02	1.59 $\pm$ 0.06	25980 $\pm$ 1806
	V3LHS_395265	p < 0.001 ***	25.05 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.03	1.46 $\pm$ 0.01	48546 $\pm$ 453
	V3LHS_395264	p < 0.001 ***	25.09 $\pm$ 0.12	0.40 $\pm$ 0.03	1.43 $\pm$ 0.00	40158 $\pm$ 1126
	V3LHS_395262	p > 0.05	24.70 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.01	1.50 $\pm$ 0.02	43485 $\pm$ 1366
<i>Pp2ca</i>	V2LHS_218016	p > 0.05	24.67 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.03	1.50 $\pm$ 0.04	46850 $\pm$ 209
	V2LHS_170343	p < 0.001 ***	25.23 $\pm$ 0.15	0.36 $\pm$ 0.03	1.63 $\pm$ 0.06	43834 $\pm$ 2970
	V2LHS_170340	p < 0.01 **	24.95 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.04	1.45 $\pm$ 0.02	52610 $\pm$ 1611
	V3LHS_355053	p < 0.001 ***	24.98 $\pm$ 0.11	0.32 $\pm$ 0.03	1.47 $\pm$ 0.03	67281 $\pm$ 1434
	V3LHS_355055	p < 0.05 *	24.67 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.04	1.48 $\pm$ 0.02	54975 $\pm$ 2709
<i>Pp2cb</i>	V2LHS_262386	p < 0.01 **	24.84 $\pm$ 0.12	0.39 $\pm$ 0.04	1.47 $\pm$ 0.03	55631 $\pm$ 3234
	V2LHS_173252	p > 0.05	24.81 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.01	1.49 $\pm$ 0.03	44934 $\pm$ 1089
	V2LHS_173251	p < 0.001 ***	25.62 $\pm$ 0.14	0.35 $\pm$ 0.01	1.57 $\pm$ 0.03	33467 $\pm$ 732
	V2LHS_173254	p > 0.05	24.57 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.02	1.49 $\pm$ 0.02	43428 $\pm$ 143
	V2LHS_173256	p < 0.001 ***	25.03 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.02	1.48 $\pm$ 0.01	44227 $\pm$ 1589
	V2LHS_220461	p > 0.05	24.66 $\pm$ 0.09	0.44 $\pm$ 0.03	1.46 $\pm$ 0.01	57428 $\pm$ 1985
<i>Pp3ca</i>	V2LHS_233939	p > 0.05	24.78 $\pm$ 0.14	0.24 $\pm$ 0.03	1.54 $\pm$ 0.06	62556 $\pm$ 6495
	V2LHS_131422	p > 0.05	24.59 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.03	1.45 $\pm$ 0.01	40917 $\pm$ 1149
	V2LHS_6289	p > 0.05	24.62 $\pm$ 0.06	0.49 $\pm$ 0.02	1.42 $\pm$ 0.02	43987 $\pm$ 2429
	V2LHS_235563	p < 0.001 ***	25.00 $\pm$ 0.12	0.47 $\pm$ 0.01	1.48 $\pm$ 0.01	42170 $\pm$ 2844
	V2LHS_262893	p > 0.05	24.73 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.02	1.49 $\pm$ 0.02	48771 $\pm$ 320
<i>Pp3cb</i>	V2LHS_66647	p < 0.05 *	24.86 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.02	1.44 $\pm$ 0.03	39844 $\pm$ 1583
	V2LHS_66652	p > 0.05	24.77 $\pm$ 0.11	0.36 $\pm$ 0.05	1.41 $\pm$ 0.01	45535 $\pm$ 2492
	V2LHS_5016	p < 0.01 **	24.92 $\pm$ 0.23	0.34 $\pm$ 0.14	1.35 $\pm$ 0.12	40157 $\pm$ 1806

Fortsetzung auf der nächsten Seite

**Tab. 1: Gezielte genetische mRNA-Depletion katalytischer Untereinheiten humaner Ser/Thr-Phosphatasen beeinflusst die circadiane Oszillationsdynamik (fortgesetzt)**

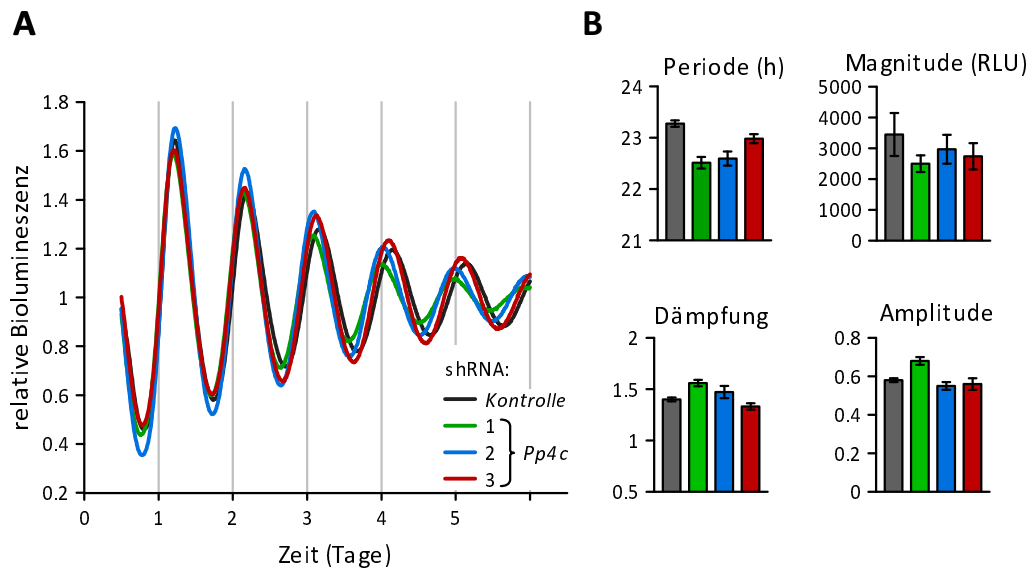
Zielgen	Konstrukt-ID	t-test	Periode MW $\pm$ SD	Amplitude MW $\pm$ SD	Dämpfung MW $\pm$ SD	Magnitude MW $\pm$ SD
	V2LHS_66649	p < 0.05 *	25.15 $\pm$ 0.34	0.40 $\pm$ 0.02	1.60 $\pm$ 0.08	45780 $\pm$ 3397
	V3LHS_372276	p < 0.001 ***	24.40 $\pm$ 0.06	0.30 $\pm$ 0.02	1.49 $\pm$ 0.03	75075 $\pm$ 1200
	V3LHS_372275	p > 0.05	24.82 $\pm$ 0.21	0.39 $\pm$ 0.01	1.48 $\pm$ 0.03	43775 $\pm$ 501
	V3LHS_372278	p < 0.001 ***	24.36 $\pm$ 0.13	0.37 $\pm$ 0.02	1.50 $\pm$ 0.02	44988 $\pm$ 1395
<i>Pp3cc</i>	V2LHS_57298	p < 0.001 ***	25.01 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.02	1.42 $\pm$ 0.01	39960 $\pm$ 1579
	V2LHS_57300	p < 0.001 ***	25.57 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.02	1.47 $\pm$ 0.01	50083 $\pm$ 1387
	V2LHS_57299	p < 0.001 ***	25.19 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.03	1.47 $\pm$ 0.01	37952 $\pm$ 2323
	V3LHS_642604	p > 0.05	24.79 $\pm$ 0.22	0.40 $\pm$ 0.01	1.52 $\pm$ 0.05	54507 $\pm$ 2149
	V3LHS_642599	p > 0.05	24.68 $\pm$ 0.20	0.37 $\pm$ 0.02	1.48 $\pm$ 0.01	49276 $\pm$ 817
	V3LHS_646122	p < 0.001 ***	24.95 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.02	1.52 $\pm$ 0.02	46499 $\pm$ 999
	V3LHS_642601	p < 0.001 ***	24.47 $\pm$ 0.15	0.39 $\pm$ 0.01	1.49 $\pm$ 0.01	55375 $\pm$ 4199
	V3LHS_642600	p < 0.001 ***	25.19 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.02	1.47 $\pm$ 0.01	49247 $\pm$ 2263
	V3LHS_642603	p < 0.001 ***	25.28 $\pm$ 0.41	0.31 $\pm$ 0.07	1.64 $\pm$ 0.20	51024 $\pm$ 16810
<i>Pp4c</i>	V3LHS_309239	p < 0.001 ***	23.55 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.01	1.55 $\pm$ 0.03	34020 $\pm$ 593
	V3LHS_309237	p < 0.001 ***	23.26 $\pm$ 0.12	0.44 $\pm$ 0.02	1.46 $\pm$ 0.01	32479 $\pm$ 1551
	V3LHS_644627	p < 0.001 ***	23.58 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.06	1.56 $\pm$ 0.04	42290 $\pm$ 486
	V3LHS_634661	p < 0.001 ***	22.88 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.02	1.51 $\pm$ 0.04	36065 $\pm$ 3052
	V3LHS_634656	p < 0.001 ***	22.80 $\pm$ 0.15	0.35 $\pm$ 0.03	1.49 $\pm$ 0.06	34211 $\pm$ 1152
	V3LHS_309235	p < 0.001 ***	23.98 $\pm$ 0.12	0.38 $\pm$ 0.02	1.53 $\pm$ 0.01	36968 $\pm$ 4173
<i>Pp5c</i>	V2LHS_57831	p < 0.05 *	24.26 $\pm$ 0.14	0.43 $\pm$ 0.02	1.47 $\pm$ 0.02	46810 $\pm$ 1049
	V2LHS_247322	p > 0.05	24.62 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.03	1.47 $\pm$ 0.04	51059 $\pm$ 1221
	V3LHS_645736	p < 0.001 ***	25.02 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.01	1.48 $\pm$ 0.01	78444 $\pm$ 3144
	V3LHS_640629	p < 0.05 *	24.91 $\pm$ 0.20	0.36 $\pm$ 0.03	1.51 $\pm$ 0.03	56028 $\pm$ 1069
<i>Pp6c</i>	V2LHS_170358	p > 0.05	24.75 $\pm$ 0.09	0.38 $\pm$ 0.01	1.48 $\pm$ 0.06	36070 $\pm$ 703
	V2LHS_170356	p < 0.001 ***	23.39 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.03	1.59 $\pm$ 0.05	36152 $\pm$ 929
	V2LHS_221327	p < 0.01 **	24.47 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.01	1.43 $\pm$ 0.01	57334 $\pm$ 907
	V2LHS_170359	p < 0.05 *	24.98 $\pm$ 0.17	0.27 $\pm$ 0.01	1.47 $\pm$ 0.04	80476 $\pm$ 2458
	V3LHS_338824	p < 0.01 **	24.63 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.01	1.44 $\pm$ 0.01	46637 $\pm$ 863
	V3LHS_338827	p < 0.001 ***	24.26 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.03	1.55 $\pm$ 0.04	52988 $\pm$ 74
<i>Pp7ca</i>	V2LHS_58003	p < 0.05 *	24.83 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.05	1.55 $\pm$ 0.05	39677 $\pm$ 920
	V2LHS_58004	p > 0.05	24.69 $\pm$ 0.12	0.35 $\pm$ 0.03	1.44 $\pm$ 0.03	48880 $\pm$ 3335
	V2LHS_58001	p > 0.05	24.72 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.02	1.48 $\pm$ 0.03	48850 $\pm$ 1275
	V3LHS_640719	p < 0.001 ***	25.16 $\pm$ 0.14	0.41 $\pm$ 0.03	1.52 $\pm$ 0.03	42417 $\pm$ 970
	V3LHS_640725	p < 0.001 ***	24.37 $\pm$ 0.17	0.39 $\pm$ 0.02	1.48 $\pm$ 0.03	48763 $\pm$ 1477
	V3LHS_640722	p < 0.001 ***	25.58 $\pm$ 0.14	0.30 $\pm$ 0.00	1.39 $\pm$ 0.03	50540 $\pm$ 1962
	V3LHS_640724	p < 0.001 ***	25.38 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.02	1.47 $\pm$ 0.01	49042 $\pm$ 2372
	V3LHS_642924	p < 0.001 ***	25.09 $\pm$ 0.15	0.38 $\pm$ 0.01	1.44 $\pm$ 0.01	47672 $\pm$ 1369
	V3LHS_640720	p > 0.05	24.82 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.04	1.49 $\pm$ 0.06	48660 $\pm$ 1943
	V3LHS_645749	p < 0.001 ***	24.52 $\pm$ 0.06	0.37 $\pm$ 0.03	1.50 $\pm$ 0.01	45418 $\pm$ 477
<i>Pp7cb</i>	V2LHS_58069	p < 0.05 *	24.46 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.02	1.64 $\pm$ 0.10	35057 $\pm$ 3301
	V2LHS_249365	p > 0.05	24.59 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.02	1.41 $\pm$ 0.03	59011 $\pm$ 3556
	V2LHS_58072	p > 0.05	24.62 $\pm$ 0.07	0.46 $\pm$ 0.01	1.47 $\pm$ 0.02	41897 $\pm$ 295
	V2LHS_58071	p > 0.05	24.82 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.06	1.51 $\pm$ 0.02	46438 $\pm$ 2103
	V2LHS_58068	p > 0.05	25.01 $\pm$ 0.28	0.31 $\pm$ 0.06	1.60 $\pm$ 0.09	26915 $\pm$ 1588

**Tab. 2: Funktionelle Redundanz der katalytischen Ser/Thr-Phosphatasen im circadianen Oszillator**

Auswertung der circadianen Parameter der Oszillationsdynamik aus dem RNAi-basierten Screening nach veränderten Perioden- und Amplituden-Phänotypen von katalytischen Phosphatase Untereinheiten, deren Isoformen (*ca*, *cb* oder *cc*) entweder einzeln oder in den angegebenen Kombinationen depletiert wurden (vgl. Abb 3.2). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes.

Phosphatase	RNAi gegen katalytische UE	Periode MW $\pm$ SD	Amplitude MW $\pm$ SD	Dämpfung MW $\pm$ SD	Magnitude MW $\pm$ SD
<i>non-silencing</i>		24.54 $\pm$ 0.17	0.50 $\pm$ 0.02	1.37 $\pm$ 0.02	7826 $\pm$ 710
<i>Pp1</i>	<i>ca</i>	24.56 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.01	1.61 $\pm$ 0.03	4841 $\pm$ 744
	<i>cb</i>	26.03 $\pm$ 0.23	0.30 $\pm$ 0.01	1.76 $\pm$ 0.06	9855 $\pm$ 750
	<i>cc</i>	25.78 $\pm$ 0.22	0.41 $\pm$ 0.05	1.53 $\pm$ 0.02	6083 $\pm$ 720
	<i>ca/cb</i>	25.55 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.01	1.61 $\pm$ 0.01	5737 $\pm$ 604
	<i>ca/cc</i>	25.05 $\pm$ 0.09	0.43 $\pm$ 0.00	1.60 $\pm$ 0.04	4475 $\pm$ 383
	<i>cb/cc</i>	26.29 $\pm$ 0.37	0.41 $\pm$ 0.03	1.58 $\pm$ 0.11	9128 $\pm$ 960
	<i>ca/cb/cc</i>	25.84 $\pm$ 0.26	0.44 $\pm$ 0.02	1.58 $\pm$ 0.09	4917 $\pm$ 141
<i>Pp2</i>	<i>ca</i>	24.96 $\pm$ 0.10	0.22 $\pm$ 0.01	1.72 $\pm$ 0.10	5581 $\pm$ 585
	<i>cb</i>	24.86 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.04	1.46 $\pm$ 0.08	3450 $\pm$ 189
	<i>ca/cb</i>	25.32 $\pm$ 0.04	0.14 $\pm$ 0.14	1.50 $\pm$ 1.50	4315 $\pm$ 4315
<i>Pp3</i>	<i>ca</i>	24.01 $\pm$ 0.48	0.13 $\pm$ 0.02	1.99 $\pm$ 0.11	5165 $\pm$ 474
	<i>cb</i>	23.60 $\pm$ 0.61	0.15 $\pm$ 0.05	1.44 $\pm$ 0.11	6181 $\pm$ 470
	<i>cc</i>	23.53 $\pm$ 0.27	0.08 $\pm$ 0.01	2.16 $\pm$ 0.30	3646 $\pm$ 90
	<i>ca/cb</i>	24.33 $\pm$ 0.31	0.16 $\pm$ 0.02	1.75 $\pm$ 0.11	5347 $\pm$ 325
	<i>ca/cc</i>	22.62 $\pm$ 0.75	0.08 $\pm$ 0.01	2.64 $\pm$ 0.81	4146 $\pm$ 430
	<i>cb/cc</i>	24.77 $\pm$ 0.08	0.16 $\pm$ 0.02	1.75 $\pm$ 0.10	5508 $\pm$ 814
	<i>ca/cb/cc</i>	24.59 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.01	1.80 $\pm$ 0.12	4912 $\pm$ 350
<i>Pp7</i>	<i>ca</i>	23.85 $\pm$ 0.18	0.14 $\pm$ 0.05	2.37 $\pm$ 1.28	5120 $\pm$ 917
	<i>cb</i>	24.09	0.04	11.21	3157
	<i>ca/cb</i>	22.74 $\pm$ 0.35	0.07 $\pm$ 0.00	1.78 $\pm$ 0.05	4076 $\pm$ 450

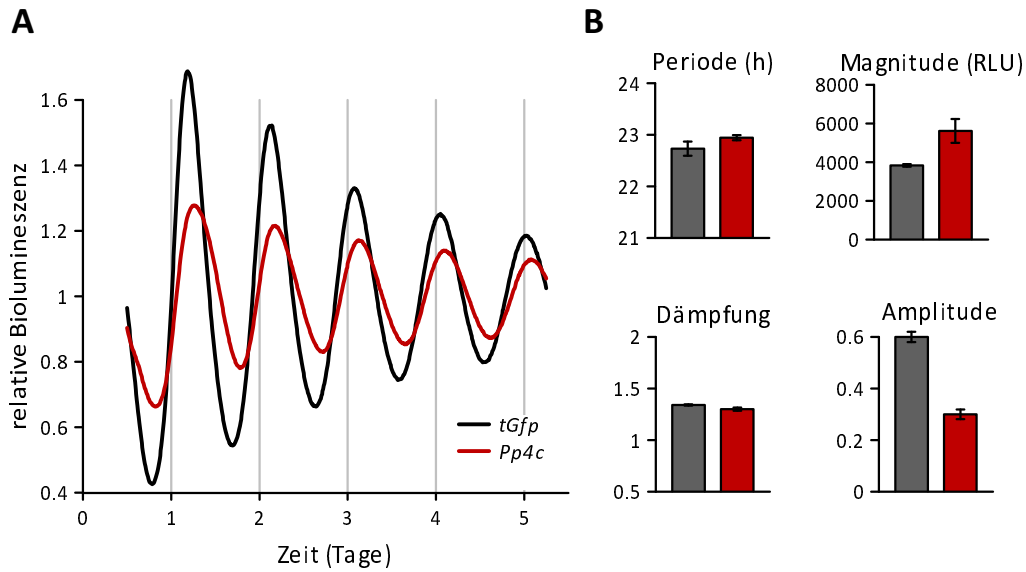
## 2 PP4C MODULIERT DIE CIRCADIANE OSZILLATIONSDYNAMIK



**Abb. 2: Genetische Depletion von *Pp4c* verkürzt die circadiane Periode in U-2 OS/*Per2-Luciferase* Reporterzellen.**

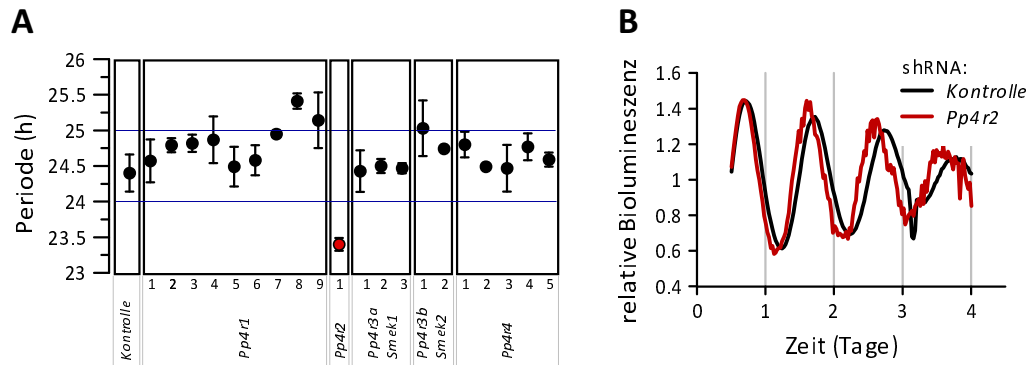
**(A)** Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Per2-Luciferase* Reporterzellen bei genetischer Depletion von *Pp4c* mittels RNAi, shRNA 1-3 entspricht der Farbkodierung in Anhang Tab. 1. **(B)** Für jedes shRNA Konstrukt gegen *Pp4c* (1-3) wurden die Parameter Periode, Magnitude, Dämpfung und Amplitude ausgewertet. Die Farbkodierung der Balken bezieht sich auf die entsprechenden shRNA Konstrukte in A. (A und B) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes.





**Abb. 3: Ektopische Überexpression von *Pp4c* beeinflusst die Oszillationsdynamik in U-2 OS/*Per2-Luciferase* Reporterzellen.**

**(A)** Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Per2-Luciferase* Reporterzellen bei Überexpression von *Pp4c* im Vergleich zur *tGfp*-Kontrolle. **(B)** Auswertung der Parameter Periode, Magnitude, Dämpfung und Amplitude. Die Farbkodierung der Balken bezieht sich auf die entsprechende Überexpression (*tGfp* oder *Pp4c*) in A. (A und B) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes.



**Abb. 4: RNAi basiertes Screening nach regulatorischen Untereinheiten der PP4c, die die circadiane Oszillationsdynamik beeinflussen.**

**(A)** RNAi-basiertes Screening nach veränderten Periodenphänotypen von einzelnen regulatorischen Phosphatase Untereinheiten in U-2OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen. Jeder Punkt repräsentiert die Periode eines spezifischen shRNA-Konstruktes gegen die jeweilige regulatorische Untereinheit bzw. der Kontroll-shRNA. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes. Ein Gen wurde als Kandidat definiert, wenn ein individuelles shRNA-Konstrukt pro regulatorische Untereinheit eine signifikante Periodenabweichung von mind.  $\pm 0,5$  h von der mittleren Periode der Kontrolle aufwies (Bereich innerhalb der horizontalen blauen Linien). **(B)** Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2OS/*Bmal1-Luciferase* Zellen für *Pp4r2* (in A rot markiert). Die Durchführung des Experimentes wurde von Prof. Erik Herzog (*Department of Biology, Washington University, St. Louis*) unterstützt.

**Tab. 3: shRNA-Konstrukte für die mRNA-Depletion von *Pp4c* regulatorischen Untereinheiten.**  
Auswertung der Periode der Oszillationsdynamik aus dem RNAi-basierten Screening von PP4c regulatorischen Untereinheiten (vgl. Abb 4). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes.

regulatorische Untereinheit	Gen-ID	#	Konstrukt-ID	Periode MW $\pm$ SD
<i>Pp4r1</i>	9989	1	V2LHS_49700	24.57 $\pm$ 0.30
		2	V2LHS_49702	24.79 $\pm$ 0.10
		3	V3LHS_635593	24.82 $\pm$ 0.12
		4	V3LHS_635594	24.87 $\pm$ 0.33
		5	V3LHS_635595	24.49 $\pm$ 0.28
		6	V3LHS_635592	24.58 $\pm$ 0.21
		7	V3LHS_635598	24.95 $\pm$ 0.05
		8	V3LHS_645958	25.41 $\pm$ 0.11
		9	V3LHS_645959	25.14 $\pm$ 0.39
<i>Pp4r2</i>	151987	1	V2LHS_34338	23.40 $\pm$ 0.09
<i>Pp4r3a</i>	55671	1	V2LHS_174606	24.43 $\pm$ 0.29
		2	V3LHS_373580	24.50 $\pm$ 0.10
		3	V3LHS_373576	24.47 $\pm$ 0.07
<i>Pp4r3b</i>	57223	1	V2LHS_212815	25.03 $\pm$ 0.39
		2	V2LHS_209963	24.74 $\pm$ 0.03
<i>Pp4r4</i>	57718	1	V2LHS_42115	24.80 $\pm$ 0.18
		2	V2LHS_42114	24.49 $\pm$ 0.03
		3	V2LHS_42113	24.47 $\pm$ 0.33
		4	V2LHS_42112	24.77 $\pm$ 0.19
		5	V2LHS_193572	24.59 $\pm$ 0.10
Kontroll-shRNA			RHS4346	24.40 $\pm$ 0.26
<i>Pp4c</i>			V3LHS_634656	23.01 $\pm$ 0.08

### 3 PP2A BEEINFLUSST DIE OSZILLATIONSDYNAMIK DER CIRCADIENEN UHR

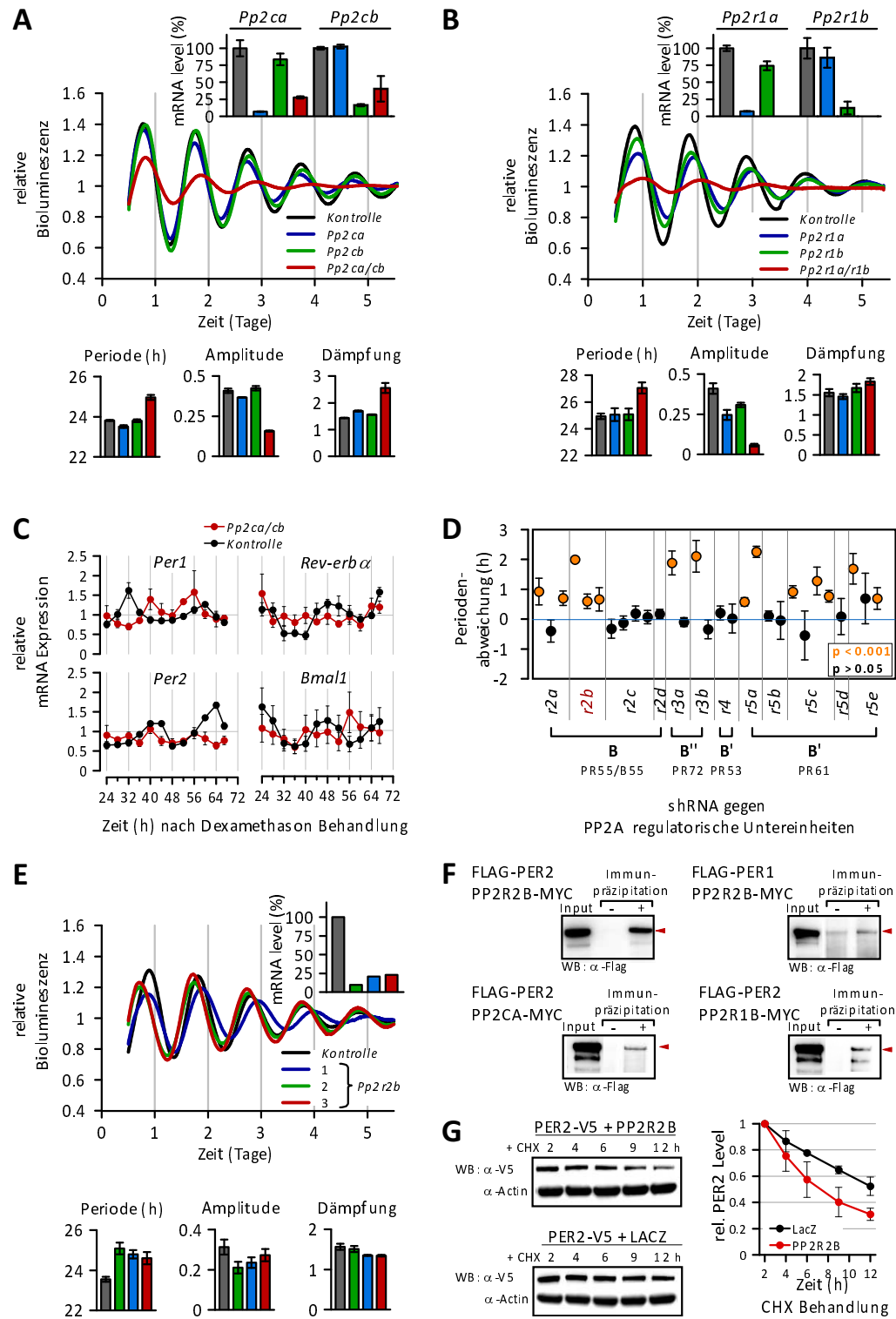
Protein Ser/Thr-Phosphatase 2A (PP2A) ist in eukaryontischen Zellen ein hoch abundantes und konserviertes Enzym, das innerhalb verschiedener Signalwege fundamentale Zellprozesse – wie beispielsweise DNA Replikation, Proteinbiosynthese, Metabolismus, Zellzyklus und Apoptose – reguliert [Sontag, 2001; Wang et al., 2008]. Das PP2A Holoenzym ist ein Trimer, bestehend aus einer 65-kDa strukturellen Untereinheit (A) und einer 36-kDa katalytischen Untereinheit (C) [Cho und Xu, 2007; Eichhorn et al., 2009]. Um die volle Aktivität zu entfalten, interagiert dieses Dimer mit einer Vielzahl an variablen regulatorischen Untereinheiten (R), die spezifisch Substrate binden können und die katalytische Aktivität, sowie die subzelluläre Lokalisation von PP2A bestimmen. Durch die daraus resultierende Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten von Holoenzymen werden die multiplen Funktionen in der Zelle vermittelt [Virshup, 2000; Sontag, 2001; Eichhorn et al., 2009]. Eine funktionale Rolle von PP2A für die Regulation der circadianen Uhr ist bisher nur in den Modellorganismen *Neurospora* [Yang et al., 2004; Schafmeier et al., 2005, 2008] und *Drosophila* [Sathyanarayanan et al., 2004; Kim und Edery, 2006] beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren erstmals eine Bedeutung von PP2A im molekularen Uhrmechanismus von Säugern.

Mittels eines systematischen RNAi-basierten Screenings in oszillierenden humanen Zellen wurde untersucht, ob sich die gezielte Depletion einzelner katalytischer Untereinheiten der PPP-Familie der Serin/Threonin-Phosphatasen auf die normale Oszillationsdynamik auswirkt und welche potentielle Rolle ausgewählte Phosphatase-Kandidaten, darunter PP4c und PP2A, für die posttranslationale Kontrolle des molekularen Oszillators spielen. In Validierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die RNAi vermittelte Depletion beider Isoformen der katalytischen und strukturellen Untereinheiten von PP2A einzeln zu keinem veränderten circadianen Perioden-Phänotyp führte, während eine Doppeldepletion – die sehr wahrscheinlich kompensatorische und funktional redundante Regulationen der Isoformen ausschließt – zu einer substantiellen Erniedrigung der Amplitude und signifikanten Periodenverlängerung, bis hin zu einer annähernd arrhythmischen Oszillation führte (siehe Abb. 5 A/B). Dieser Phänotyp manifestierte sich auch in der rhythmischen Genexpression von essentiellen Uhrgenen und deutet daraufhin, dass die Gendosis und damit Aktivität von PP2A für die molekulare Rhythmusgenerierung in Säugern essentiell ist (siehe Abb. 5 C). Aufgrund der multiplen Funktionen von PP2A in der Zelle steht man allerdings vor der Herausforderung, zwischen direkten Effekten auf die molekulare Uhr und globalen Effekten, die potentiell auf die molekulare Uhr rückkoppeln, zu diskriminieren. Um die Problematik der unspezifischen Wirkung der Depletion der katalytischen Untereinheiten zu umgehen und zu untersuchen, ob PP2A tatsächlich einen essentiellen Regulator innerhalb der negativen

Rückkopplungsschleife darstellt, wurden alle regulatorischen Untereinheiten von PP2A – die aufgrund von Sequenzhomologien in 4 Genfamilien klassifiziert werden – mittels RNAi depletiert und die Auswirkung auf die Oszillationsdynamik untersucht (siehe Abb. 5 D). Als Kandidat wurde die regulatorische Untereinheit *Pp2r2b* (PR55 $\beta$ , *Drosophila* Ortholog *tws*) identifiziert, die die Periode bei mRNA-Depletion signifikant verlängert und damit eine spezifische Funktion von PP2A im Säugetieroszillator unterstützt (siehe Abb. 5 E). Mittels Co-Immunpräzipitation von PP2R2B mit kanonischen Uhrproteinen konnte nur PER2 als spezifisches Zielprotein identifiziert werden (siehe Abb. 5 F). Weiterhin wurde eine Interaktion von PER2 mit der katalytischen Untereinheit PP2CA, sowie mit der strukturellen Untereinheit PP2R1B nachgewiesen. PER2 unterliegt innerhalb der negativen Rückkopplung zahlreichen spezifischen Phosphorylierungen an Ser/Thr-Aminosäuren durch Kinasen. Diese posttranslationalen Modifikationen beeinflussen dessen spatio-temporale Funktion, wie z. B. die Regulation der Proteinstabilität, die an der Aufrechterhaltung der zeitlichen Verzögerung innerhalb der negativen Rückkopplung maßgeblich beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass PP2R2B die Halblebenszeit von PER2 verkürzt, was einen ersten mechanistischen Hinweis auf eine funktionelle Rolle von PP2A in der circadianen Uhr von Säugern liefert (siehe Abb. 5 G). In weiterführenden Untersuchungen wäre ein interessanter Aspekt, ob die PP2A Aktivität eine Schlüsselrolle in der Regulation des Phosphorylierungsstatus von PER2 spielt. Eine Methode wäre hierbei mittels Massenspektrometrie zeitlich aufgelöste Phosphorylierungsmuster auf PER2 zu identifizieren und dessen Regulation durch PP2A zu untersuchen. Diese Erkenntnisse hätten das Potential zu einem besseren Verständnis zu führen, wie posttranslationale Modifikationen – insbesondere Dephosphorylierungen durch Phosphatasen – dynamisch den circadianen Oszillator beeinflussen.

**Abb. 5 (gegenüberliegende Seite): PP2A beeinflusst die Oszillationsdynamik**

Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen bei RNAi vermittelter Depletion der PP2A katalytischen Untereinheiten *Pp2ca* und *Pp2cb* **(A)** bzw. der PP2A strukturellen Untereinheiten *Pp2r1a* und *Pp2r1b* **(B)**. Für jeden Ansatz wurden die Parameter Periode, Dämpfung und Amplitude ausgewertet. Die Farbkodierung der Balken bezieht sich auf die entsprechenden Oszillationen. Nach der Biolumineszenzmessung wurde die Effizienz der Deletion mittels RT-qPCR analysiert und relativ zur Kontroll-shRNA dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes. **(C)** Humane U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen wurden lentiviral entweder mit einer Kontroll-shRNA (schwarze Kreise) oder einer shRNA gegen *Pp2ca* und *Pp2cb* (rote Kreise) transduziert. Selektionierte Zellen wurden ausgesät und die RNA 24 h nach Dexamethason-Synchronisation in 4 h-Intervallen über einen Zeitraum von 48 h extrahiert. Die Genexpressionslevel von Uhrgenen wurden mittels RT-qPCR analysiert. Die Quantifizierung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durch Normalisierung auf *Gapdh* und relativ zur mittleren Expression aller Zeitpunkte der Kontrollzellen. Dargestellt sind pro Zeitpunkt die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes. **(D)** RNAi-basiertes Screening im 96-Well Format nach veränderten Periodenphänotypen von einzelnen regulatorischen PP2A Untereinheiten in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen. Jeder Punkt repräsentiert die Periodenabweichung eines spezifischen shRNA-Konstruktes gegen die jeweilige regulatorische Untereinheit zur mittleren Periode der Kontroll-shRNA von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes das  $\pm$  SD. Ein Gen wurde als Kandidat definiert, wenn alle individuelle shRNA-Konstrukte pro Untereinheit eine signifikante Periodenabweichung in die gleiche Richtung zeigten (gelbe Datenpunkte, *t*-test  $p < 0.001$ ). **(E)** Die trend-eliminierte, rhythmische Luciferase-Aktivität in U-2 OS/*Bmal1-Luciferase* Reporterzellen bei genetischer Depletion von *Pp2r2b* mittels RNAi. Für jedes shRNA-Konstrukt gegen *Pp2r2b* (1-3) wurde nach der Biolumineszenzmessung die Effizienz der Herunterregulation von *Pp2r2b* mRNA mittels RT-qPCR analysiert und relativ zur Kontroll-shRNA dargestellt. Für jeden Ansatz wurden die Parameter Periode, Dämpfung und Amplitude ausgewertet. Die Farbkodierung der Balken bezieht sich auf die entsprechenden Oszillationen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Replikaten  $\pm$  SD eines Experimentes. **(F)** PER2 mit einem N-terminalen Flag-Tag wurde mit PP2A Untereinheiten in HEK 293 ektopisch exprimiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und Proteinlysate hergestellt, die für die Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -Myc an Protein-G gekoppelten Agarose Beads eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle diente eine Immunpräzipitation ohne  $\alpha$ -Myc. Die Präzipitate wurden im Westernblot mit  $\alpha$ -Flag analysiert. Die roten Pfeile markieren die Migrationsbande von PER2. Zusätzlich wurden für jeden Ansatz Input-Kontrollen mitgeführt und im Westernblot mit  $\alpha$ -Flag bzw.  $\alpha$ -Myc (nicht gezeigt) analysiert, um die Überexpression der entsprechenden Proteine zu bestätigen. **(G)** HEK 293 Zellen wurden mit *Per2-V5* und *Pp2r2b* bzw. *LacZ* (Kontrolle) transfiziert und 24 Stunden nach Aussaat mit dem Proteintranslationshemmer CHX behandelt. Die PER2 Proteinabundanz wurde mittels Westernblot analysiert (links, repräsentative Darstellung) und durch Normalisierung auf ACTIN quantifiziert (rechts). Fehlerbalken repräsentieren den Bereich von zwei unabhängigen Replikaten pro Zeitpunkt.



**Tab. 4: shRNA-Konstrukte für die mRNA-Depletion von *Pp2A* regulatorischen Untereinheiten.** Auswertung der Periode der Oszillationsdynamik aus dem RNAi-basierten Screening von PP2A regulatorischen Untereinheiten (vgl. Abb 5 D). Dargestellt ist die Periodenabweichung zur mittleren Periode der Kontroll-shRNA von drei unabhängigen Replikaten eines Experimentes  $\pm$  Standardabweichung. Die Farbkodierung der shRNA-Konstrukte gegen *Pp2r2b* bezieht sich auf die in der Abb. 5 E dargestellten Oszillationen.

regulatorische Untereinheit	Gen-ID	#	Konstrukt-ID	Periodenabweichung MW $\pm$ SD
<i>Pp2r2a</i>	5520	1	V2LHS_78652	0.93 $\pm$ 0.45
		2	V2LHS_78650	-0.40 $\pm$ 0.37
		3	V2LHS_78653	0.70 $\pm$ 0.24
<i>Pp2r2b</i>	5521	1	V2LHS_47637	1.99 $\pm$ 0.07
		2	V2LHS_4045	0.60 $\pm$ 0.24
		3	V2LHS_47634	0.66 $\pm$ 0.39
<i>Pp2r2c</i>	5522	1	V2LHS_16700	-0.33 $\pm$ 0.32
		2	V2LHS_185695	-0.13 $\pm$ 0.23
		3	V2LHS_185693	0.19 $\pm$ 0.26
		4	V2LHS_185694	0.07 $\pm$ 0.22
<i>Pp2r2d</i>	55844	1	V2LHS_175728	0.17 $\pm$ 0.15
<i>Pp2r3a</i>	5523	1	V2LHS_39813	1.88 $\pm$ 0.40
		2	V2LHS_39816	-0.10 $\pm$ 0.15
<i>Pp2r3b</i>	28227	1	V2LHS_71705	2.10 $\pm$ 0.53
		2	V2LHS_85691	-0.34 $\pm$ 0.31
<i>Pp2r4</i>	5524	1	V2LHS_66644	0.21 $\pm$ 0.23
		2	V2LHS_66645	0.02 $\pm$ 0.48
<i>Pp2r5a</i>	5525	1	V2LHS_57968	0.58 $\pm$ 0.14
		2	V2LHS_57971	2.25 $\pm$ 0.19
<i>Pp2r5b</i>	5526	1	V2LHS_57909	0.10 $\pm$ 0.17
		2	V2LHS_57908	-0.04 $\pm$ 0.63
<i>Pp2r5c</i>	5527	1	V2LHS_170355	0.91 $\pm$ 0.21
		2	V2LHS_170352	-0.54 $\pm$ 0.82
		3	V2LHS_170351	1.27 $\pm$ 0.47
		4	V2LHS_220869	0.77 $\pm$ 0.19
<i>Pp2r5d</i>	5528	1	V2LHS_57937	0.09 $\pm$ 0.61
<i>Pp2r5e</i>	5529	1	V2LHS_57881	1.69 $\pm$ 0.51
		2	V2LHS_57882	0.69 $\pm$ 0.85
		3	V2LHS_57880	0.69 $\pm$ 0.37
<b>Scaffold Untereinheiten</b>				
<i>Pp2r1a</i>	5518		V2LHS_197495	
<i>Pp2r1b</i>	5519		V2LHS_170347	
<b>katalytische Untereinheiten</b>				
<i>Pp2ca</i>	5515		V2LHS_170340	
<i>Pp2cb</i>	5516		V2LHS_173251	



# ABKÜRZUNGEN

3'UTR .....	<i>engl.</i> 3' untranslated region
AS .....	Aminosäure
BCA .....	Bicinchoninsäure
bp .....	Basenpaar
BSA .....	<i>engl.</i> bovine serum albumin
cDNA .....	complementary DNA
ChIP .....	Chromatin-Immunpräipitation
CHX .....	Cycloheximid
Co-IP .....	Co-Immunpräzipitation
D .....	Asparaginsäure
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DNA .....	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP .....	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT .....	Dithiothreitol
E .....	Glutaminsäure
EDTA .....	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr .....	Ethidiumbromid
FRAP .....	<i>engl.</i> Fluorescence Recovery after Photobleaching
G .....	Glycin
H .....	Histidin
h .....	human
H3 .....	Histon 3
HEPES .....	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC .....	<i>engl.</i> high performance liquid chromatography
IP .....	Immunpräzipitation
K .....	Lysin
kb .....	Kilo-Basenpaar
kDa .....	Kilodalton
Kontroll shRNA ....	nicht gegen eine spezifische mRNA Sequenz gerichtete shRNA
LARI/II .....	<i>engl.</i> luciferase assay reagent
LB .....	<i>engl.</i> lysogeny broth, Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien
Luc .....	Luciferase
m .....	murin
mRNA .....	messenger RNA
mut .....	Mutante
MW .....	Mittelwert
N .....	Asparagin
n.d. ....	nicht detektiert

ORF .....	<i>engl.</i> open reading frame
PBS .....	<i>engl.</i> phosphate buffered saline
PP .....	Protein Phosphatase
PPM .....	<i>engl.</i> protein phosphatase $Mg^{2+}$ - oder $Mn^{2+}$ -dependent
PPP .....	<i>engl.</i> phosphoprotein phosphatase
R .....	Arginin
RLU .....	<i>engl.</i> relative light units
RNA .....	<i>engl.</i> ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROR .....	<i>engl.</i> retinoic acid-related orphan receptors
RRE .....	<i>engl.</i> ROR response element
RT .....	Raumtemperatur
RT-qPCR .....	<i>engl.</i> Real-Time-quantitative-PCR
s.u. ....	siehe unten
SCN .....	suprachiasmatischer Nucleus
SD .....	Standardabweichung
SDS-PAGE .....	<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfat- polyacrylamide gel electrophoresis
Ser .....	Serin
shRNA .....	<i>engl.</i> short hairpin RNA
SILAC .....	<i>engl.</i> stable isotope labeling using amino acids in cell culture
TAE .....	Tris/Acetat/EDTA
TBS .....	tris buffered saline
tGFP .....	<i>engl.</i> turbo green fluorescent protein
Thr .....	Threonin
TSE .....	Tris/Sucrose/EDTA
Tyr .....	Tyrosin
U .....	Unit
UE .....	Untereinheit
V .....	Valin
WB .....	Westernblot
°C .....	Grad Celsius

# LITERATURVERZEICHNIS

- Akashi, Makoto, Tsuchiya, Yoshiki, Yoshino, Takao und Nishida, Eisuke: Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. In: *Mol Cell Biol*, Band 22(6):S. 1693–1703, 2002.
- Akten, Bikem, Jauch, Eike, Genova, Ginka K., Kim, Eun Young, Edery, Isaac, Raabe, Thomas und Jackson, F Rob: A role for CK2 in the Drosophila circadian oscillator. In: *Nat Neurosci*, Band 6(3):S. 251–257, 2003.
- Albrecht, Urs: Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. In: *Neuron*, Band 74(2):S. 246–260, 2012.
- Alonso, Andres, Sasin, Joanna, Bottini, Nunzio, Friedberg, Ilan, Friedberg, Iddo, Osterman, Andrei, Godzik, Adam, Hunter, Tony, Dixon, Jack und Mustelin, Tomas: Protein tyrosine phosphatases in the human genome. In: *Cell*, Band 117(6):S. 699–711, 2004.
- Andreeva, A. V. und Kutuzov, M. A.: PPP family of protein Ser/Thr phosphatases: two distinct branches? In: *Mol Biol Evol*, Band 18(3):S. 448–452, 2001.
- Asher, Gad, Gatfield, David, Stratmann, Markus, Reinke, Hans, Dibner, Charna, Kreppel, Florian, Mostoslavsky, Raul, Alt, Frederick W. und Schibler, Ueli: SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. In: *Cell*, Band 134(2):S. 317–328, 2008.
- Aton, Sara J. und Herzog, Erik D.: Come together, right...now: synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. In: *Neuron*, Band 48(4):S. 531–534, 2005.
- Bass, Joseph und Takahashi, Joseph S.: Circadian integration of metabolism and energetics. In: *Science*, Band 330(6009):S. 1349–1354, 2010.
- Bechtold, David A., Gibbs, Julie E. und Loudon, Andrew S I.: Circadian dysfunction in disease. In: *Trends Pharmacol Sci*, Band 31(5):S. 191–198, 2010.
- Bugge, Anne, Feng, Dan, Everett, Logan J., Briggs, Erika R., Mullican, Shannon E., Wang, Fenfen, Jager, Jennifer und Lazar, Mitchell A.: Rev-erbalpha and Rev-erbbeta coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. In: *Genes Dev*, Band 26(7):S. 657–667, 2012.
- Cha, Joonseok, Chang, Shwu-Shin, Huang, Guocun, Cheng, Ping und Liu, Yi: Control of WHITE COLLAR localization by phosphorylation is a critical step in the circadian negative feedback process. In: *EMBO J*, Band 27(24):S. 3246–3255, 2008.

- Cha, Joonseok, Yuan, Haiyan und Liu, Yi: Regulation of the activity and cellular localization of the circadian clock protein FRQ. In: *J Biol Chem*, Band 286(13):S. 11469–11478, 2011.
- Cheng, Hai-Ying M., Papp, Joseph W., Varlamova, Olga, Dziema, Heather, Russell, Brandon, Curfman, John P., Nakazawa, Takanobu, Shimizu, Kimiko, Okamura, Hitoshi, Impey, Soren und Obrietan, Karl: microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. In: *Neuron*, Band 54(5):S. 813–829, 2007.
- Cheng, Hai-Ying Mary und Obrietan, Karl: Revealing a role of microRNAs in the regulation of the biological clock. In: *Cell Cycle*, Band 6(24):S. 3034–3035, 2007.
- Chi, Y., Huddleston, M. J., Zhang, X., Young, R. A., Annan, R. S., Carr, S. A. und Deshaies, R. J.: Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. In: *Genes Dev*, Band 15(9):S. 1078–1092, 2001.
- Cho, Han, Zhao, Xuan, Hatori, Megumi, Yu, Ruth T., Barish, Grant D., Lam, Michael T., Chong, Ling-Wa, DiTacchio, Luciano, Atkins, Annette R., Glass, Christopher K., Liddle, Christopher, Auwerx, Johan, Downes, Michael, Panda, Satchidananda und Evans, Ronald M.: Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- $\alpha$  and REV-ERB- $\beta$ . In: *Nature*, Band 485(7396):S. 123–127, 2012.
- Cho, Uhn Soo und Xu, Wenqing: Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. In: *Nature*, Band 445(7123):S. 53–57, 2007.
- Cohen, Patricia T W.: Protein phosphatase 1–targeted in many directions. In: *J Cell Sci*, Band 115(Pt 2):S. 241–256, 2002a.
- Cohen, Patricia T W., Philp, Amanda und Vázquez-Martin, Cristina: Protein phosphatase 4—from obscurity to vital functions. In: *FEBS Lett*, Band 579(15):S. 3278–3286, 2005.
- Cohen, Philip: The origins of protein phosphorylation. In: *Nat Cell Biol*, Band 4(5):S. E127–E130, 2002b.
- Dibner, Charna, Schibler, Ueli und Albrecht, Urs: The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. In: *Annu Rev Physiol*, Band 72:S. 517–549, 2010.
- Duong, Hao A., Robles, Maria S., Knutti, Darko und Weitz, Charles J.: A molecular mechanism for circadian clock negative feedback. In: *Science*, Band 332(6036):S. 1436–1439, 2011.
- Eichhorn, Pieter J A., Creighton, Menno P. und Bernards, René: Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. In: *Biochim Biophys Acta*, Band 1795(1):S. 1–15, 2009.
- Eide, Erik J., Vielhaber, Erica L., Hinz, William A. und Virshup, David M.: The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I $\epsilon$ . In: *J Biol Chem*, Band 277(19):S. 17248–17254, 2002.

- Eide, Erik J., Woolf, Margaret F., Kang, Heeseog, Woolf, Peter, Hurst, William, Camacho, Fernando, Vielhaber, Erica L., Giovanni, Andrew und Virshup, David M.: Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. In: *Mol Cell Biol*, Band 25(7):S. 2795–2807, 2005.
- Etchegaray, Jean-Pierre, Lee, Choogon, Wade, Paul A. und Reppert, Steven M.: Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. In: *Nature*, Band 421(6919):S. 177–182, 2003.
- Fang, Yanshan, Sathyanarayanan, Sriram und Sehgal, Amita: Post-translational regulation of the Drosophila circadian clock requires protein phosphatase 1 (PP1). In: *Genes Dev*, Band 21(12):S. 1506–1518, 2007.
- Feng, Dan und Lazar, Mitchell A.: Clocks, metabolism, and the epigenome. In: *Mol Cell*, Band 47(2):S. 158–167, 2012.
- Feng, Dan, Liu, Tao, Sun, Zheng, Bugge, Anne, Mullican, Shannon E., Alenghat, Theresa, Liu, X Shirley und Lazar, Mitchell A.: A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. In: *Science*, Band 331(6022):S. 1315–1319, 2011.
- Fujimoto, Yoshito, Yagita, Kazuhiro und Okamura, Hitoshi: Does mPER2 protein oscillate without its coding mRNA cycling?: post-transcriptional regulation by cell clock. In: *Genes Cells*, Band 11(5):S. 525–530, 2006.
- Gaj, Thomas, Gersbach, Charles A. und Barbas, Carlos F, 3rd: ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. In: *Trends Biotechnol*, Band 31(7):S. 397–405, 2013.
- Gallego, Monica, Kang, Heeseog und Virshup, David M.: Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2. In: *Biochem J*, Band 399(1):S. 169–175, 2006.
- Gallego, Monica und Virshup, David M.: Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. In: *Curr Opin Cell Biol*, Band 17(2):S. 197–202, 2005.
- Gallego, Monica und Virshup, David M.: Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. In: *Nat Rev Mol Cell Biol*, Band 8(2):S. 139–148, 2007.
- Harada, Yuko, Sakai, Mihoko, Kurabayashi, Nobuhiro, Hirota, Tsuyoshi und Fukada, Yoshitaka: Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta. In: *J Biol Chem*, Band 280(36):S. 31714–31721, 2005.
- Harms, Emily, Young, Michael W. und Saez, Lino: CK1 and GSK3 in the Drosophila and mammalian circadian clock. In: *Novartis Found Symp*, Band 253:S. 267–77; discussion 102–9, 277–84, 2003.
- Hirayama, Jun und Sassone-Corsi, Paolo: Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock. In: *Curr Opin Genet Dev*, Band 15(5):S. 548–556, 2005.

- Honkanen, R. E. und Golden, T.: Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? In: *Curr Med Chem*, Band 9(22):S. 2055–2075, 2002.
- Itaka, Chisato, Miyazaki, Koyomi, Akaike, Toshihiro und Ishida, Norio: A role for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the mammalian circadian clock. In: *J Biol Chem*, Band 280(33):S. 29397–29402, 2005.
- Isojima, Yasushi, Nakajima, Masato, Ukai, Hideki, Fujishima, Hiroshi, Yamada, Rikuhiko G., Masumoto, Koh-hei, Kiuchi, Reiko, Ishida, Mayumi, Ukai-Tadenuma, Maki, Minami, Yoichi, Kito, Ryotaku, Nakao, Kazuki, Kishimoto, Wataru, Yoo, Seung-Hee, Shimomura, Kazuhiro, Takao, Toshifumi, Takano, Atsuko, Kojima, Toshio, Nagai, Katsuya, Sakaki, Yoshiyuki, Takahashi, Joseph S. und Ueda, Hiroki R.: CKIepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 106(37):S. 15744–15749, 2009.
- Janssens, V. und Goris, J.: Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. In: *Biochem J*, Band 353(Pt 3):S. 417–439, 2001.
- Janssens, Veerle, Longin, Sari und Goris, Jozef: PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). In: *Trends Biochem Sci*, Band 33(3):S. 113–121, 2008.
- Jenuwein, T. und Allis, C. D.: Translating the histone code. In: *Science*, Band 293(5532):S. 1074–1080, 2001.
- Johnson, Sam A. und Hunter, Tony: Kinomics: methods for deciphering the kinome. In: *Nat Methods*, Band 2(1):S. 17–25, 2005.
- Jouffe, Céline, Cretenet, Gaspard, Symul, Laura, Martin, Eva, Atger, Florian, Naef, Felix und Gachon, Frédéric: The circadian clock coordinates ribosome biogenesis. In: *PLoS Biol*, Band 11(1):S. e1001455, 2013.
- Kim, Eun Young und Edery, Isaac: Balance between DBT/CKIepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of Drosophila CLOCK protein. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 103(16):S. 6178–6183, 2006.
- Kloeker, S., Bryant, J. C., Strack, S., Colbran, R. J. und Wadzinski, B. E.: Carboxymethylation of nuclear protein serine/threonine phosphatase X. In: *Biochem J*, Band 327 (Pt 2):S. 481–486, 1997.
- Ko, Caroline H. und Takahashi, Joseph S.: Molecular components of the mammalian circadian clock. In: *Hum Mol Genet*, Band 15 Spec No 2:S. R271–R277, 2006.
- Kodadek, Thomas, Sikder, Devanjan und Nalley, Kip: Keeping transcriptional activators under control. In: *Cell*, Band 127(2):S. 261–264, 2006.
- Koike, Nobuya, Yoo, Seung-Hee, Huang, Hung-Chung, Kumar, Vivek, Lee, Choogon, Kim, Tae-Kyung und Takahashi, Joseph S.: Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. In: *Science*, Band 338(6105):S. 349–354, 2012.

- Kondratov, Roman V., Chernov, Mikhail V., Kondratova, Anna A., Gorbacheva, Victoria Y., Gudkov, Andrei V. und Antoch, Marina P.: BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. In: *Genes Dev*, Band 17(15):S. 1921–1932, 2003.
- Kondratov, Roman V., Shamanna, Rashmi K., Kondratova, Anna A., Gorbacheva, Victoria Y. und Antoch, Marina P.: Dual role of the CLOCK/BMAL1 circadian complex in transcriptional regulation. In: *FASEB J*, Band 20(3):S. 530–532, 2006.
- Kurabayashi, Nobuhiro, Hirota, Tsuyoshi, Sakai, Mihoko, Sanada, Kamon und Fukada, Yoshitaka: DYRK1A and glycogen synthase kinase 3beta, a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. In: *Mol Cell Biol*, Band 30(7):S. 1757–1768, 2010.
- Lamia, Katja A., Sachdeva, Uma M., DiTacchio, Luciano, Williams, Elliot C., Alvarez, Jacqueline G., Egan, Daniel F., Vasquez, Debbie S., Juguilon, Henry, Panda, Satchidananda, Shaw, Reuben J., Thompson, Craig B. und Evans, Ronald M.: AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. In: *Science*, Band 326(5951):S. 437–440, 2009.
- Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R., Loudon, A. S. und Reppert, S. M.: Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. In: *Cell*, Band 107(7):S. 855–867, 2001.
- Lee, Hyeong-min, Chen, Rongmin, Kim, Hyukmin, Etchegaray, Jean-Pierre, Weaver, David R. und Lee, Choogon: The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 108(39):S. 16451–16456, 2011.
- Lin, Jui-Ming, Kilman, Valerie L., Keegan, Kevin, Paddock, Brie, Emery-Le, Myai, Rosbash, Michael und Allada, Ravi: A role for casein kinase 2alpha in the *Drosophila* circadian clock. In: *Nature*, Band 420(6917):S. 816–820, 2002.
- Liu, Andrew C., Lewis, Warren G. und Kay, Steve A.: Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. In: *Nat Chem Biol*, Band 3(10):S. 630–639, 2007a.
- Liu, Andrew C., Tran, Hien G., Zhang, Eric E., Priest, Aaron A., Welsh, David K. und Kay, Steve A.: Redundant function of REV-ERBalpha and beta and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. In: *PLoS Genet*, Band 4(2):S. e1000023, 2008.
- Liu, Andrew C., Welsh, David K., Ko, Caroline H., Tran, Hien G., Zhang, Eric E., Priest, Aaron A., Buhr, Ethan D., Singer, Oded, Meeker, Kirsten, Verma, Inder M., Doyle, Francis J, 3rd, Takahashi, Joseph S. und Kay, Steve A.: Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. In: *Cell*, Band 129(3):S. 605–616, 2007b.

- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods*, Band 25(4):S. 402–408, 2001.
- Loros, J. J. und Dunlap, J. C.: Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. In: *Annu Rev Physiol*, Band 63:S. 757–794, 2001.
- Lowrey, Phillip L. und Takahashi, Joseph S.: Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. In: *Annu Rev Genomics Hum Genet*, Band 5:S. 407–441, 2004.
- Maier, Bert, Wendt, Sabrina, Vanselow, Jens T., Wallach, Thomas, Reischl, Silke, Oehmke, Stefanie, Schlosser, Andreas und Kramer, Achim: A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock. In: *Genes Dev*, Band 23(6):S. 708–718, 2009.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. und Sudarsanam, S.: The protein kinase complement of the human genome. In: *Science*, Band 298(5600):S. 1912–1934, 2002.
- Masri, Selma und Sassone-Corsi, Paolo: Plasticity and specificity of the circadian epigenome. In: *Nat Neurosci*, Band 13(11):S. 1324–1329, 2010.
- Maywood, Elizabeth S., O'Neill, John, Wong, Gabriel K Y., Reddy, Akhilesh B. und Hastings, Michael H.: Circadian timing in health and disease. In: *Prog Brain Res*, Band 153:S. 253–269, 2006a.
- Maywood, Elizabeth S., Reddy, Akhilesh B., Wong, Gabriel K Y., O'Neill, John S., O'Brien, John A., McMahon, Douglas G., Harmar, Anthony J., Okamura, Hitoshi und Hastings, Michael H.: Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. In: *Curr Biol*, Band 16(6):S. 599–605, 2006b.
- Menet, Jerome S., Rodriguez, Joseph, Abruzzi, Katharine C. und Rosbash, Michael: Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation. In: *Elife*, Band 1:S. e00011, 2012.
- Moore, Robert Y., Speh, Joan C. und Leak, Rehana K.: Suprachiasmatic nucleus organization. In: *Cell Tissue Res*, Band 309(1):S. 89–98, 2002.
- Muratani, Masafumi und Tansey, William P.: How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. In: *Nat Rev Mol Cell Biol*, Band 4(3):S. 192–201, 2003.
- Nakahata, Yasukazu, Kaluzova, Milota, Grimaldi, Benedetto, Sahar, Saurabh, Hirayama, Jun, Chen, Danica, Guarente, Leonard P. und Sassone-Corsi, Paolo: The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. In: *Cell*, Band 134(2):S. 329–340, 2008.
- Nakajima, Masato, Imai, Keiko, Ito, Hiroshi, Nishiwaki, Taeko, Murayama, Yoriko, Iwasaki, Hideo, Oyama, Tokitaka und Kondo, Takao: Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. In: *Science*, Band 308(5720):S. 414–415, 2005.



- Nishii, Keigo, Yamanaka, Iori, Yasuda, Maya, Kiyohara, Yota B., Kitayama, Yoko, Kondo, Takao und Yagita, Kazuhiro: Rhythmic post-transcriptional regulation of the circadian clock protein mPER2 in mammalian cells: a real-time analysis. In: *Neurosci Lett*, Band 401(1-2):S. 44–48, 2006.
- Olsen, Jesper V., Blagoev, Blagoy, Gnad, Florian, Macek, Boris, Kumar, Chanchal, Mortensen, Peter und Mann, Matthias: Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. In: *Cell*, Band 127(3):S. 635–648, 2006.
- Partch, Carrie L., Shields, Katherine F., Thompson, Carol L., Selby, Christopher P. und Sancar, Aziz: Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 103(27):S. 10467–10472, 2006.
- Ponten, J. und Saksela, E.: Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. In: *Int J Cancer*, Band 2(5):S. 434–447, 1967.
- Preitner, Nicolas, Damiola, Francesca, Lopez-Molina, Luis, Zakany, Jozsef, Duboule, Denis, Albrecht, Urs und Schibler, Ueli: The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. In: *Cell*, Band 110(2):S. 251–260, 2002.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. und Menaker, M.: Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. In: *Science*, Band 247(4945):S. 975–978, 1990.
- Reischl, Silke und Kramer, Achim: Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock. In: *FEBS Lett*, Band 585(10):S. 1393–1399, 2011.
- Reischl, Silke, Vanselow, Katja, Westermarck, Pål O., Thierfelder, Nadine, Maier, Bert, Herzog, Hanspeter und Kramer, Achim: Beta-TrCP1-mediated degradation of PERIOD2 is essential for circadian dynamics. In: *J Biol Rhythms*, Band 22(5):S. 375–386, 2007.
- Reppert, Steven M. und Weaver, David R.: Coordination of circadian timing in mammals. In: *Nature*, Band 418(6901):S. 935–941, 2002.
- Ripperger, Jürgen A. und Schibler, Ueli: Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. In: *Nat Genet*, Band 38(3):S. 369–374, 2006.
- Robles, Maria S., Boyault, Cyril, Knutti, Darko, Padmanabhan, Kiran und Weitz, Charles J.: Identification of RACK1 and protein kinase C $\alpha$  as integral components of the mammalian circadian clock. In: *Science*, Band 327(5964):S. 463–466, 2010.
- Sahar, Saurabh, Zocchi, Loredana, Kinoshita, Chisato, Borrelli, Emiliana und Sassone-Corsi, Paolo: Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3 $\beta$ -mediated phosphorylation. In: *PLoS One*, Band 5(1):S. e8561, 2010.
- Sanada, Kamon, Harada, Yuko, Sakai, Mihoko, Todo, Takeshi und Fukada, Yoshitaka: Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. In: *Genes Cells*, Band 9(8):S. 697–708, 2004.

- Sanada, Kamon, Okano, Toshiyuki und Fukada, Yoshitaka: Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. In: *J Biol Chem*, Band 277(1):S. 267–271, 2002.
- Sathyanarayanan, Sriram, Zheng, Xiangzhong, Xiao, Rui und Sehgal, Amita: Posttranslational regulation of Drosophila PERIOD protein by protein phosphatase 2A. In: *Cell*, Band 116(4):S. 603–615, 2004.
- Schafmeier, Tobias, Diernfellner, Axel, Schäfer, Astrid, Dintsis, Orfeas, Neiss, Andrea und Brunner, Michael: Circadian activity and abundance rhythms of the Neurospora clock transcription factor WCC associated with rapid nucleo-cytoplasmic shuttling. In: *Genes Dev*, Band 22(24):S. 3397–3402, 2008.
- Schafmeier, Tobias, Haase, Andrea, Káldi, Krisztina, Scholz, Johanna, Fuchs, Marc und Brunner, Michael: Transcriptional feedback of Neurospora circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. In: *Cell*, Band 122(2):S. 235–246, 2005.
- Schibler, Ueli und Naef, Felix: Cellular oscillators: rhythmic gene expression and metabolism. In: *Curr Opin Cell Biol*, Band 17(2):S. 223–229, 2005.
- Schibler, Ueli und Sassone-Corsi, Paolo: A web of circadian pacemakers. In: *Cell*, Band 111(7):S. 919–922, 2002.
- Schlosser, Andreas, Vanselow, Jens T. und Kramer, Achim: Comprehensive phosphorylation site analysis of individual phosphoproteins applying scoring schemes for MS/MS data. In: *Anal Chem*, Band 79(19):S. 7439–7449, 2007.
- Schmutz, Isabelle, Wendt, Sabrina, Schnell, Anna, Kramer, Achim, Mansuy, Isabelle M. und Albrecht, Urs: Protein phosphatase 1 (PP1) is a post-translational regulator of the mammalian circadian clock. In: *PLoS One*, Band 6(6):S. e21325, 2011.
- Shi, Yigong: Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. In: *Cell*, Band 139(3):S. 468–484, 2009.
- Shim, Hong Seok, Kim, Hyunjung, Lee, Jiwon, Son, Gi Hoon, Cho, Sehyung, Oh, Tae H., Kang, Sang Hyeon, Seen, Dong-Seung, Lee, Kun Ho und Kim, Kyungjin: Rapid activation of CLOCK by Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C mediates resetting of the mammalian circadian clock. In: *EMBO Rep*, Band 8(4):S. 366–371, 2007.
- Shirogane, Takahiro, Jin, Jianping, Ang, Xiaolu L. und Harper, J Wade: SCF<sup>beta</sup>-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein. In: *J Biol Chem*, Band 280(29):S. 26863–26872, 2005.
- Sontag, E.: Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. In: *Cell Signal*, Band 13(1):S. 7–16, 2001.
- Spengler, Mary L., Kuropatwinski, Karen K., Schumer, Molly und Antoch, Marina P.: A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation. In: *Cell Cycle*, Band 8(24):S. 4138–4146, 2009.

- Stratmann, Markus, Suter, David Michael, Molina, Nacho, Naef, Felix und Schibler, Ueli: Circadian Dbp transcription relies on highly dynamic BMAL1-CLOCK interaction with E boxes and requires the proteasome. In: *Mol Cell*, Band 48(2):S. 277–287, 2012.
- Takano, Atsuko, Isojima, Yasushi und Nagai, Katsuya: Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry. In: *J Biol Chem*, Band 279(31):S. 32578–32585, 2004.
- Tamanini, Filippo, Yagita, Kazuhiro, Okamura, Hitoshi und van der Horst, Gijsbertus T J.: Nucleocytoplasmic shuttling of clock proteins. In: *Methods Enzymol*, Band 393:S. 418–435, 2005.
- Tamaru, Teruya, Hirayama, Jun, Isojima, Yasushi, Nagai, Katsuya, Norioka, Shigemi, Takamatsu, Ken und Sassone-Corsi, Paolo: CK2alpha phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. In: *Nat Struct Mol Biol*, Band 16(4):S. 446–448, 2009.
- Tansey, W. P.: Transcriptional activation: risky business. In: *Genes Dev*, Band 15(9):S. 1045–1050, 2001.
- Thomas, D. und Tyers, M.: Transcriptional regulation: Kamikaze activators. In: *Curr Biol*, Band 10(9):S. R341–R343, 2000.
- Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptáček, L. J. und Fu, Y. H.: An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. In: *Science*, Band 291(5506):S. 1040–1043, 2001.
- Tomita, Jun, Nakajima, Masato, Kondo, Takao und Iwasaki, Hideo: No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. In: *Science*, Band 307(5707):S. 251–254, 2005.
- Tsuchiya, Yoshiki, Akashi, Makoto, Matsuda, Mitsuhiro, Goto, Kyoko, Miyata, Yoshihiko, Node, Koichi und Nishida, Eisuke: Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms. In: *Sci Signal*, Band 2(73):S. ra26, 2009.
- Uchida, Yoshimi, Hirayama, Jun und Nishina, Hiroshi: A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses. In: *Biol Pharm Bull*, Band 33(4):S. 535–544, 2010.
- Ueda, Hiroki R., Hayashi, Satoko, Chen, Wenbin, Sano, Motoaki, Machida, Masayuki, Shigeyoshi, Yasufumi, Iino, Masamitsu und Hashimoto, Seiichi: System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. In: *Nat Genet*, Band 37(2):S. 187–192, 2005.
- Ukai-Tadenuma, Maki, Kasukawa, Takeya und Ueda, Hiroki R.: Proof-by-synthesis of the transcriptional logic of mammalian circadian clocks. In: *Nat Cell Biol*, Band 10(10):S. 1154–1163, 2008.
- Vanselow, K. und Kramer, A.: Role of phosphorylation in the mammalian circadian clock. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, Band 72:S. 167–176, 2007.

- Vanselow, Katja, Vanselow, Jens T., Westermarck, Pål O., Reischl, Silke, Maier, Bert, Korte, Thomas, Herrmann, Andreas, Herzel, Hanspeter, Schlosser, Andreas und Kramer, Achim: Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). In: *Genes Dev*, Band 20(19):S. 2660–2672, 2006.
- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z. H. und Virshup, D. M.: Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. In: *Mol Cell Biol*, Band 20(13):S. 4888–4899, 2000.
- Virshup, D. M.: Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. In: *Curr Opin Cell Biol*, Band 12(2):S. 180–185, 2000.
- Virshup, David M. und Shenolikar, Shirish: From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. In: *Mol Cell*, Band 33(5):S. 537–545, 2009.
- Wallach, Thomas, Schellenberg, Katja, Maier, Bert, Kalathur, Ravi Kiran Reddy, Porras, Pablo, Wanker, Erich E., Futschik, Matthias E. und Kramer, Achim: Dynamic circadian protein-protein interaction networks predict temporal organization of cellular functions. In: *PLoS Genet*, Band 9(3):S. e1003398, 2013.
- Wang, Baijing, Zhang, Peng und Wei, Qun: Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases. In: *Sci China C Life Sci*, Band 51(6):S. 487–494, 2008.
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M. und Reppert, S. M.: Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. In: *Neuron*, Band 14(4):S. 697–706, 1995.
- Xu, Ying, Padiath, Quasar S., Shapiro, Robert E., Jones, Christopher R., Wu, Susan C., Saigoh, Noriko, Saigoh, Kazumasa, Ptáček, Louis J. und Fu, Ying-Hui: Functional consequences of a CKIdelta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. In: *Nature*, Band 434(7033):S. 640–644, 2005.
- Yagita, Kazuhiro, Yamanaka, Iori, Koinuma, Satoshi, Shigeyoshi, Yasufumi und Uchiyama, Yasuo: Mini screening of kinase inhibitors affecting period-length of mammalian cellular circadian clock. In: *Acta Histochem Cytochem*, Band 42(3):S. 89–93, 2009.
- Yamaguchi, Shun, Isejima, Hiromi, Matsuo, Takuya, Okura, Ryusuke, Yagita, Kazuhiro, Kobayashi, Masaki und Okamura, Hitoshi: Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. In: *Science*, Band 302(5649):S. 1408–1412, 2003.
- Yamamoto, Takuro, Nakahata, Yasukazu, Soma, Haruhiko, Akashi, Makoto, Mamine, Takayoshi und Takumi, Toru: Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. In: *BMC Mol Biol*, Band 5:S. 18, 2004.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M. und Tei, H.: Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. In: *Science*, Band 288(5466):S. 682–685, 2000.

- Yang, Yuhong, He, Qun, Cheng, Ping, Wrage, Philip, Yarden, Oded und Liu, Yi: Distinct roles for PP1 and PP2A in the *Neurospora* circadian clock. In: *Genes Dev*, Band 18(3):S. 255–260, 2004.
- Yang, Z. und Sehgal, A.: Role of molecular oscillations in generating behavioral rhythms in *Drosophila*. In: *Neuron*, Band 29(2):S. 453–467, 2001.
- Yin, Lei und Lazar, Mitchell A.: The orphan nuclear receptor Rev-erbalpha recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian *Bmal1* gene. In: *Mol Endocrinol*, Band 19(6):S. 1452–1459, 2005.
- Yin, Lei, Wang, Jing, Klein, Peter S. und Lazar, Mitchell A.: Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. In: *Science*, Band 311(5763):S. 1002–1005, 2006.
- Yoshitane, Hikari, Takao, Toshifumi, Satomi, Yoshinori, Du, Ngoc-Hien, Okano, Toshiyuki und Fukada, Yoshitaka: Roles of CLOCK phosphorylation in suppression of E-box-dependent transcription. In: *Mol Cell Biol*, Band 29(13):S. 3675–3686, 2009.
- Zhang, Eric E., Liu, Andrew C., Hirota, Tsuyoshi, Miraglia, Loren J., Welch, Genevieve, Pongsawakul, Pagkapol Y., Liu, Xianzhong, Atwood, Ann, Huss, Jon W, 3rd, Janes, Jeff, Su, Andrew I., Hogenesch, John B. und Kay, Steve A.: A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells. In: *Cell*, Band 139(1):S. 199–210, 2009.
- Zhang, Xiaohong, Ozawa, Yukiyasu, Lee, Heehyoung, Wen, Yu-Der, Tan, Tse-Hua, Wadzinski, Brian E. und Seto, Edward: Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. In: *Genes Dev*, Band 19(7):S. 827–839, 2005.
- Zhou, Guisheng, Mihindukulasuriya, Kathie A., MacCorkle-Chosnek, Rebecca A., Van Hooser, Aaron, Hu, Mickey C-T., Brinkley, B. R. und Tan, Tse-Hua: Protein phosphatase 4 is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. In: *J Biol Chem*, Band 277(8):S. 6391–6398, 2002.



# DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde an dem, von Prof. Hans-Dieter Volk geleiteten, Institut für Medizinische Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Achim Kramer angefertigt.

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Hans-Dieter Volk für die Betreuung und für die wissenschaftliche Ausbildung am Institut für Medizinische Immunologie bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Achim Kramer für die Bereitstellung des Projektes, seinem Vertrauen und der intensiven sowie inspirativen Betreuung in den letzten Jahren. Er hat mich – mit viel Diskussionsfreudigkeit, einem hohen Anspruch an Datenpräsentation und -diskussion und nicht zuletzt durch seine gute Spürnase für die wesentlichen chronobiologischen Details – intensiv in die gute wissenschaftliche Praxis eingeführt und mich fokussiertes Denken gelehrt.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Kollegen der AG Chronobiologie, die mich auf meinem Weg all die Jahre begleitet haben. All diesen „Chronostars“ danke ich für jegliche tatkräftige Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit, die vielen motivierenden und aufheiternden Worte, lustigen Kaffeeepäuschen, konstruktiven Ideen und Diskussionsbeiträge, die dieses Forschungsprojekt und meine Entwicklung als Wissenschaftlerin bereichert haben. Insbesondere bei den Phosphatase 4 Experimenten standen mir Proteinstabilitätsexpertin Katja Schellenberg, ChIP-Experte Dr. Roman Klemz, IP-Experte Dr. Thomas Wallach, RNAi-Experte Dr. Bert Maier und mein „Praktikant“ Prof. Eric Herzog mit wissenschaftlichem Rat und Tat zur Seite. Ein großes Dankeschön geht an Astrid Grudziecki für die Einsatzbereitschaft in Sachen Bestellungen und die mit hilfreichen Ratschlägen aus ihrem Repertoire an experimentellen Zaubertricks und mit ihrem treuen Volk der stets fleißigen Chrono-Hiwis Kathrin Diesenberger, Sandra Korge und Barbara Koller oft Licht in den dunklen Proben-Dschungel gebracht und verschollen geglaubte Reagenzien wieder ausfindig gemacht hat. Annette Hayungs danke ich für die Bewahrung des Überblicks in allen bürokratischen Angelegenheiten.

Mein großer Dank gilt zwei besonderen Personen, Jeannine Mazuch und Mathias Teschke, die mich im Laboralltag und abseits der Wissenschaft immer zum Lachen gebracht haben. Sie waren für mich nicht nur sehr geschätzte, mitfühlende und zuverlässige Kollegen, sondern sind mir auch wichtige Freunde geworden, die stets ein offenes Ohr für mich haben.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mir immer das Gefühl der Geborgenheit geben und mir Mut zusprachen. Ohne ihre liebevolle Fürsorge wäre diese Arbeit nicht zu dem Werk geworden, dass es heute ist. Roman danke ich, dass er mit viel Humor, Energie, Geduld, Liebe und Verständnis an meiner Seite ist und mir immer den Rücken stärkte. Liebe Eltern, ihr habt mich mein ganzes Leben lang begleitet, ihr teilt alle Probleme und alle Freuden mit mir, ihr helft mir immer den richtigen Weg zu finden und Hürden zu überwinden. Für eure Liebe und Warmherzigkeit möchte ich mich bei Euch bedanken!





# SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe mich außerdem weder anderwärts um einen Doktorgrad beworben noch besitze ich bereits einen entsprechenden Doktorgrad. Die dem angestrebten Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 11.02.2014

Sabrina Klemz



# PUBLIKATIONEN

## Publikationen

Teschke, Mathias; **Wendt, Sabrina**; Kawaguchi, So; Kramer, Achim und Meyer, Bettina: A circadian clock in Antarctic krill: an endogenous timing system governs metabolic output rhythms in the euphausiid species *Euphausia superba*. In: *PLoS One*, Band 6(10):S. e26090, **2011**.

Schmutz, Isabelle; **Wendt, Sabrina**; Schnell, Anna; Kramer, Achim; Mansuy, Isabelle M. und Albrecht, Urs: Protein phosphatase 1 (PP1) is a post-translational regulator of the mammalian circadian clock. In: *PLoS One*, Band 6(6):S. e21325, **2011**.

**Wendt, Sabrina**; Schlosser, Andreas; Wallach, Thomas; Maier, Bert; Kramer, Achim: A functional role for Protein Phosphatase 2A in the mammalian circadian clock. *Abstract in: Eur J Med Res*, Band 15 (Supplement I): I-XXII, 1-240, **2010**.

Maier, Bert; **Wendt, Sabrina**; Vanselow, Jens T.; Wallach, Thomas; Reischl, Silke; Oehmeke, Stefanie; Schlosser, Andreas und Kramer, Achim: A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock. In: *Genes Dev*, Band 23(6):S. 708–718, **2009**.

Hattermann K; Müller M; Nitsche Andreas; **Wendt, Sabrina**; Donoso Mantke O und Niedrig M.: Susceptibility of different eukaryotic cell lines to SARS-coronavirus. In *Arch Virol.*, Vol 150(5):1023-31, **2005**.

## Poster und Präsentationen

*Poster* EU-Clock, Frauenchiemsee **2007**: RNAi based approach to identify novel circadian clock genes in mammalian cell culture.

*Vortrag und Poster* bei der EU-Clock Summer School Chronobiology Ungarn **2007**: RNAi based approach to identify novel circadian clock genes in mammalian cell culture.

*Vortrag* am Institut für Medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, **2008**: A role of Casein Kinase 2 in the mammalian circadian clock.

*Vortrag* bei der 20th European Student's Conference, Charité Universitätsmedizin Berlin, **2010**: Mammalian circadian dynamics: The impact of Phosphatases.

*Vortrag* am Institut für Medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, **2010**: A role of Protein Phosphatase 2A in regulating mammalian circadian dynamics.

### **Auszeichnungen**

Gewinnerin in der Biochemie-Session. 20th European Student's Conference, Charité Universitätsmedizin Berlin, **2010**

Berlin, den 11.02.2014

Sabrina Klemz